

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 479**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2011 PCT/EP2011/062287**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012 WO12007593**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2011 E 11734078 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 2593792**

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

30 Prioridad:

06.09.2010 GB 201014715

16.07.2010 US 399781 P

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

06.07.2020

73 Titular/es:

VIB VZW (33.3%)

Rijvisschestraat 120

9052 Ghent , BE;

VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL (33.3%) y

THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND

STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (33.3%)

72 Inventor/es:

STEYAERT, JAN;

PARDON, ELS;

RASMUSSEN, SØREN;

FUNG, JUAN;

KOBILKA, BRIAN y

LAEREMANS, TOON

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 771 479 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 [0001] La presente invención se refiere al campo de la biología estructural y la señalización de los GPCR. En particular, la presente invención se refiere a nanocuerpos que se unen específicamente a un epítipo conformacional comprendido en un sitio de unión a proteínas G de un estado conformacional activo de un receptor acoplado a proteínas G (GPCR), donde dicho estado conformacional activo de dicho GPCR se caracteriza por una afinidad mejorada de dicho GPCR por un agonista. Más específicamente, la presente invención proporciona nanocuerpos
10 que son capaces de aumentar la estabilidad de un GPCR en su estado conformacional activo. Los nanocuerpos de la presente invención se pueden usar como una herramienta para la caracterización estructural y funcional de receptores acoplados a proteínas G unidos a varios ligandos naturales y sintéticos, así como para esfuerzos de cribado y descubrimiento de fármacos dirigidos a los GPCR.

ANTECEDENTES

- 15 [0002] Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) son la familia más grande de proteínas de membrana en el genoma humano. Juegan papeles esenciales en las respuestas fisiológicas a un conjunto diverso de ligandos tales como aminas biogénicas, aminoácidos, péptidos, proteínas, prostanoides, fosfolípidos, ácidos grasos, nucleósidos, nucleótidos, iones Ca^{2+} , odorantes, estimulantes del gusto amargos y dulces, feromonas y protones (Heilker et al. 2009). Los GPCR son dianas terapéuticas para una amplia variedad de enfermedades. Los GPCR
20 se caracterizan por siete dominios de transmembrana con un amino terminal extracelular y un carboxilo terminal intracelular, y se llaman también receptores siete transmembranarios o heptahelicoidales (Rosenbaum et al. 2009). La rodopsina, un GPCR que está muy especializado para la detección eficiente de luz, ha sido el paradigma para la señalización y la biología estructural de los GPCR debido a su estabilidad bioquímica y abundancia natural en la retina bovina (Hofmann et al. 2009). En cambio, muchos GPCR exhiben un comportamiento funcional complejo modulando la actividad de múltiples isoformas de proteínas G, así como vías de señalización independientes de proteínas G (por ejemplo, β -arrestina). En algunos casos, un GPCR puede exhibir una actividad basal hacia una
25 vía de señalización específica incluso en ausencia de un ligando. Los ligandos ortoestéricos que actúan sobre un GPCR pueden tener un espectro de efectos en las vías de señalización aguas abajo. Los agonistas completos activan al máximo el receptor. Los agonistas parciales provocan una estimulación submáxima incluso en concentraciones de saturación. Los agonistas inversos inhiben la actividad basal, mientras que los antagonistas neutros no tienen efecto sobre la actividad basal, pero bloquean competitivamente la unión de otros ligandos.
30

- [0003] El comportamiento complejo de los GPCR para hormonas y neurotransmisores se puede atribuir a su plasticidad estructural (Kobilka y Deupi, 2007). La evidencia de estudios funcionales y biofísicos muestra que los GPCR pueden existir en múltiples estados conformacionales distintos funcionalmente (Kobilka y Deupi 2007).
35 Aunque esta plasticidad estructural y comportamiento dinámico es esencial para la función normal, contribuye a su inestabilidad bioquímica y dificultad en la obtención de estructuras cristalinas de alta resolución. Hasta la fecha, se han declarado estructuras cristalinas para el β_2 AR humano (Rasmussen et al. 2007; Rosenbaum et al. 2007; Cherezov et al. 2007; Hanson et al. 2008), el β_1 AR aviar (Warne et al. 2008) y el receptor de adenosina A2 humano (Jaakola et al. 2008). Mientras que la rodopsina se puede cristalizar a partir de proteína no modificada aislada de tejido nativo, estos otros GPCR requirieron la expresión en sistemas recombinantes, la estabilización de un estado
40 inactivo por un agonista inverso y modificaciones bioquímicas para estabilizar la proteína receptora. La primera estructura cristalina del β_2 AR fue estabilizada por un Fab selectivo (Rasmussen et al. 2007). Estructuras posteriores del β_2 AR y el receptor de adenosina A2 se obtuvieron con la ayuda de la ingeniería de proteínas: la inserción de lisozima T4 en el tercer bucle intracelular como se ha descrito originalmente para el β_2 AR (Rosenbaum et al. 2007).
45 Finalmente, se cultivaron cristales del β_1 AR aviar a partir de proteína diseñada con truncamientos amino y carboxilo terminales y la delección del tercer bucle intracelular, también 6 sustituciones de aminoácidos que mejoraron la termoestabilidad de la proteína purificada (Warne et al. 2008).

- [0004] La obtención de estructuras de un estado activo de un GPCR es más difícil porque este estado es relativamente inestable. Estudios de la duración de la fluorescencia muestran que el β_2 AR es estructuralmente heterogéneo en presencia de concentraciones de saturación de un agonista completo (Ghanouni et al. 2001). Esta heterogeneidad estructural es incompatible con la formación de cristales. La estabilización del estado activo del β_2 AR requiere la presencia de su proteína G cognada Gs, la proteína estimuladora para la adenililciclase (Yao et al. 2009). Hasta la fecha, la única estructura de estado activo de GPCR es la de la opsina, la forma libre de ligando de la rodopsina (Park et al. 2008). Estos cristales se cultivaron en pH ácido (5,5) donde se ha demostrado que la
55 opsina es similar estructuralmente a la rodopsina activada por luz (metarrodopsina II) a pH fisiológico por

espectroscopia FTIR. Aunque el β_2 AR exhibe también una actividad basal más alta a pH reducido, es bioquímicamente inestable (Ghanouni et al. 2000).

[0005] La solicitud internacional WO 2004/092199 A2 y la solicitud de EE.UU. US 2007/077597 divulgan péptidos derivados de los aminoácidos carboxilo terminales de una proteína G nativa o análogos peptídicos de alta afinidad derivados de los mismos, cuyos péptidos son capaces de unirse específicamente a los GPCR en el sitio donde se une la proteína G. La solicitud internacional WO 2004/035614 divulga péptidos que se unen específicamente a una subunidad $G\alpha$ de una proteína G. Sin embargo, estos péptidos no se unen directamente a un GPCR. La solicitud internacional WO 2010/043650 describe nanocuerpos contra los GPCR y usos terapéuticos de los mismos, pero no dice nada de su uso para estabilizar los GPCR en una conformación activa.

[0006] Desentrañar las estructuras de diferentes estados conformacionales funcionales de los GPCR en complejo con varios ligandos y proteínas naturales y sintéticos es valioso tanto para comprender los mecanismos de la transducción de señales de GPCR como también para esfuerzos de descubrimiento de fármacos basado en la estructura. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas herramientas directas para el análisis estructural de alta resolución de conformeros individuales de los GPCR.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0007] Un primer aspecto de la invención se refiere a un nanocuerpo que se une específicamente a un epítipo conformacional comprendido en un sitio de unión a proteínas G de un estado conformacional activo de un GPCR, estabilizando así el estado conformacional activo del GPCR, donde dicho estado conformacional activo de dicho GPCR se caracteriza por una afinidad mejorada de dicho GPCR por un agonista; donde dicho nanocuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:29, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:29.

[0008] Según una forma de realización, dicho nanocuerpo es capaz de unirse específicamente a un GPCR unido a un agonista.

[0009] Según una forma de realización, dicho nanocuerpo es capaz de aumentar la termoestabilidad del estado conformacional activo del GPCR tras la unión.

[0010] Según una forma de realización, dicho GPCR es una proteína de mamíferos o una proteína vegetal o una proteína microbiana o una proteína vírica o una proteína de insecto. Dicha proteína de mamíferos puede ser una proteína humana. En particular, dicho GPCR se puede elegir del grupo que comprende un GPCR de la familia del glutamato de los GPCR, un GPCR de la familia de la rodopsina de los GPCR, un GPCR de la familia de adhesión de los GPCR, un GPCR de la familia Frizzled/Taste2 de los GPCR y un GPCR de la familia de la secretina de los GPCR. Más específicamente, dicho GPCR puede ser un receptor adrenérgico, tal como un receptor α adrenérgico o un receptor β -adrenérgico, o donde dicho GPCR es un receptor muscarínico, tal como un receptor muscarínico M1 o un receptor muscarínico M2 o un receptor muscarínico M3 o un receptor muscarínico M4 o un receptor muscarínico M5, o donde dicho GPCR es un receptor de angiotensina, tal como un receptor de angiotensina II de tipo 1 o un receptor de angiotensina II de tipo 2.

[0011] Un segundo aspecto de la invención se refiere a un complejo que comprende (i) un nanocuerpo según la invención, donde dicho nanocuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:29, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:29, (ii) un GPCR en un estado conformacional activo y (iii), opcionalmente, un ligando del receptor. Dicho ligando del receptor se puede elegir del grupo que comprende una molécula pequeña, una proteína, un péptido, un andamio de proteína, un ácido nucleico, un ion, un carbohidrato o un anticuerpo, o cualquier fragmento adecuado derivado. Dicho complejo puede estar en una forma solubilizada o inmovilizado en un soporte sólido. En formas de realización particulares, dicho complejo es cristalino.

[0012] Un tercer aspecto de la invención se refiere a una composición celular que comprende un nanocuerpo según la invención, donde dicho nanocuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:29, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:29 y/o un complejo según la invención. Preferiblemente, el nanocuerpo comprendido en la composición celular es capaz de estabilizar y/o inducir un estado conformacional activo de un GPCR tras la unión de dicho nanocuerpo.

[0013] Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de un nanocuerpo según la invención o un complejo según la invención o una composición celular según la invención para estabilizar y/o inducir un estado conformacional activo de un GPCR.

5 [0014] Según una forma de realización, dicho nanocuerpo o dicho complejo o dicha composición celular se puede usar para cristalizar y/o a resolver la estructura de un GPCR en un estado conformacional activo.

[0015] Según una forma de realización adicional, dicho nanocuerpo o dicho complejo o dicha composición celular de la invención se puede usar para atrapar un GPCR en un estado conformacional activo, opcionalmente con un ligando del receptor o con una o más proteínas de señalización aguas abajo.

10 [0016] La invención abarca también un método de atrapamiento de un GPCR en un estado conformacional activo, donde dicho método comprende los pasos de:

- 15 (i) aplicar una solución que contiene un GPCR en una pluralidad de estados conformacionales a un soporte sólido que posee un nanocuerpo inmovilizado según la invención, donde dicho nanocuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:29, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:29 y
- (ii) formar un complejo del nanocuerpo y el GPCR y
- (iii) eliminar las moléculas débilmente unidas o no unidas,

donde el GPCR es atrapado en un estado conformacional activo.

20 [0017] El método anterior de atrapamiento de un GPCR en un estado conformacional activo puede comprender además el paso de purificar el complejo.

[0018] Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de un nanocuerpo según la invención para modular la actividad de señalización de GPCR, más específicamente, para bloquear la señalización mediada por proteínas G.

25 [0019] Otras aplicaciones y usos de los nanocuerpos de la invención estarán claros para la persona experta a partir de la divulgación adicional en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0020]

FIGURA 1. Nanocuerpos específicos de β_2 AR se unen y estabilizan un estado activo del receptor.

30 (a) Rastro representativo de una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para Nb80. El β_2 AR purificado (20 μ M) unido a un agonista (β_2 AR-agonista) se incubó con y sin 40 μ M de Nb80 (negro y azul, respectivamente) durante 2 h a temperatura ambiente antes del análisis por FPLC. En presencia de Nb80, el pico de elución del β_2 AR-agonista aumenta en la absorbancia UV (280 nm) y eluye en un volumen anterior que el β_2 AR-agonista solo, con una reducción simultánea en el pico de elución del Nb80 (verde), lo que sugiere la formación del complejo β_2 AR-agonista-Nb80. La incubación de β_2 AR (20 μ M) unido a un agonista inverso con Nb80 (rojo) resultó en un desplazamiento menor y un aumento menor en la absorbancia UV en comparación con el complejo β_2 AR-agonista-Nb80.

35

(b) Experimentos de unión de competencia de respuesta a la dosis en membranas de células de insecto Sf9 que expresan β_2 AR. Siete nanocuerpos que se unen a β_2 AR por SEC se incubaron individualmente durante 90 min a temperatura ambiente con membranas que expresan β_2 AR. Los siete nanocuerpos aumentaron la afinidad de β_2 AR por el (-)-isoproterenol (tabla 3). El Nb80 (azul) se seleccionó como el nanocuerpo cabeza de serie. Los datos representan la media $\pm$ s.e. de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

40

(c) Un ensayo funcional basado en fluorescencia usando receptor purificado marcado con monobromobimano (mBBr) muestra que 1 μ M de Nb80 (azul) estabiliza un estado más activo del β_2 AR (unido al agonista completo (-)-isoproterenol) en comparación con el receptor en ausencia de Nb80 (negro). El estado activo se caracteriza por una extinción de la fluorescencia del mBBr y un desplazamiento hacia el rojo en la fluorescencia del mBBr (Yao et al., 2009).

45

FIGURA 2. Transferencias puntuales representativas que muestran la especificidad de los nanocuerpos por la estructura terciaria del β_2 AR.

(a) Cantidades iguales de β_2 AR purificado nativo o desnaturalizado por SDS unido a un agonista (parte superior y media, respectivamente), o β_2 AR nativo unido a un agonista inverso (parte inferior) se transfirieron por triplicado a bandas de nitrocelulosa. Las bandas se bloquearon con leche en polvo sin grasa al 5% en PBS (pH 7,4) con Tween-20 al 0,05% y luego se incubaron con 1 mg/ml de los nanocuerpos indicados diluidos en tampón de bloqueo. La unión de nanocuerpos fue detectada por un anticuerpo primario de ratón anti-histidina (a-6His), seguido de la incubación con un anticuerpo secundario marcado con IR-800 anti-ratón de cabra. El anticuerpo M1, que reconoce el epítipo FLAG lineal, se marcó con Alexa-688 y detectó directamente el β_2 AR. Las transferencias puntuales se escanearon y se obtuvieron imágenes usando el sistema Odyssey Infrared Imaging System (Li-cor Biosciences). Las transferencias de detección de nanocuerpos se procesaron por separado de las transferencias de detección de β_2 AR por M1, ya que se usaron dos canales diferentes (800 nm frente a 700 nm, respectivamente) para la obtención de imágenes; por lo tanto, las transferencias no se pueden comparar y cuantificar directamente (es decir, la comparación de la unión de nanocuerpos frente a la unión de M1 son solo de naturaleza cualitativa).

(b) Transferencias puntuales representativas que muestran nanocuerpos con una unión reducida a β_2 AR plegado en su forma nativa.

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

Se incubó el β_2 AR purificado (20 μ M) unido a un agonista con y sin 40 μ M de nanocuerpos (negro y azul, respectivamente) durante 2 h a temperatura ambiente antes del análisis por cromatografía de exclusión por tamaño. También se analizaron las muestras de β_2 AR (20 μ M) unido a un agonista inverso en presencia de nanocuerpos (rojo). En presencia de varios nanocuerpos (Nb72, Nb65, Nb71, Nb69, Nb67 y Nb84), el pico de elución del β_2 AR-agonista aumenta en la absorbancia UV (280 nm) y eluye en un volumen anterior (línea negra) que el β_2 AR-agonista solo (azul), con una reducción simultánea en el pico de elución del Nb80 (verde), lo que sugiere la formación del complejo β_2 AR-agonista-Nb80. No se observa la formación de un complejo agonista inverso de β_2 AR-Nb80 (línea roja).

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

El β_2 AR purificado (20 μ M) unido a un agonista se incubó con y sin 40 μ M de nanocuerpos (negro y azul, respectivamente) durante 2 h a temperatura ambiente antes del análisis por cromatografía de exclusión por tamaño.

FIGURA 5. Espectros de emisión de fluorescencia que muestran cambios conformacionales inducidos por nanocuerpos del β_2 AR marcado con monobromobimano

Los nanocuerpos que aumentan la afinidad de unión a un agonista para el β_2 AR estabilizan un estado activo del receptor. Un ensayo funcional basado en fluorescencia usando receptor purificado marcado con monobromobimano (mBB) muestra que 1 μ M de los nanocuerpos 65, 67, 69, 71, 72 y 84 (rojo) estabilizan un estado más activo del β_2 AR (unido al agonista completo isoproterenol) en comparación con el receptor en ausencia de nanocuerpos (negro). Este estado activo se caracteriza por una extinción de la fluorescencia del mBB y un desplazamiento hacia el rojo en la fluorescencia del mBB (Yao et al., 2009).

FIGURA 6. Efecto del Nb80 sobre la estructura y función del β_2 AR

(a) El dibujo ilustra el movimiento de la sonda de bimano sensible al entorno unida a la Cys265^{6,27} en el extremo citoplásmico del TM6 desde un entorno hidrofóbico más oculto hacia una posición más polar expuesta al solvente durante la activación del receptor que resulta en una reducción en la fluorescencia observada en la figura 6b-c.

(b)-(c) Espectros de emisión de fluorescencia que muestran cambios conformacionales inducidos por un ligando del β_2 AR marcado con monobromobimano reconstituido en partículas de lipoproteína de alta densidad (mBB- β_2 AR/HDL) en ausencia (línea continua negra) o presencia del agonista completo isoproterenol (ISO, línea ancha discontinua verde), el agonista inverso ICI-118,551 (ICI, línea discontinua negra), el heterotrímero de G_s (línea continua roja), el nanocuerpo-80 (Nb80, líneas continuas azules) y las combinaciones de G_s con ISO (línea ancha discontinua roja), Nb80 con ISO (línea ancha discontinua azul) y Nb80 con ICI (línea discontinua azul).

(d)-(f) Curvas de unión de ligando para el ISO en competencia contra el [³H]-dihidroalprenolol ([³H]-DHA) para **d**, β_2 AR/HDL reconstituido con heterotrímero de G_s en ausencia o presencia de GTPyS, **e**,

β_2 AR/HDL en ausencia y presencia de Nb80 y f, β_2 AR-T4L/HDL en ausencia y presencia de Nb80. Las barras de error representan errores estándar.

FIGURA 7. Empaquetamiento del complejo agonista- β_2 AR-T4L-Nb80 en cristales formados en la fase cúbica lipídica.

Tres vistas diferentes de la estructura del β_2 AR indicadas en naranja, Nb80 en azul y agonista en verde. La lisozima T4 (T4L) no se pudo modelar debido a una densidad electrónica pobre. Su posible posición está indicada por el círculo azul claro con líneas discontinuas negras conectadas a los extremos intracelulares del TM5 y el TM6 donde se fusiona en la construcción β_2 AR-T4L. Se usó PyMOL (<http://www.pymol.org>) para la preparación de todas las figuras.

FIGURA 8. Comparación de las estructuras cristalinas del β_2 AR estabilizadas por agonista inverso y agonista-Nb80.

La estructura del β_2 AR-T4L unido al agonista inverso carazolol (β_2 AR-Cz) se muestra en azul con el carazolol en amarillo. La estructura del β_2 AR-T4L unido al agonista y estabilizado por el Nb80 (β_2 AR-Nb80) se muestra en naranja con el agonista en verde. Estas dos estructuras se alinearon usando la función de alineación Pymol. (a) Vista lateral de las estructuras superpuestas que muestra cambios estructurales significativos en la parte intracelular y opuesta a la proteína G de los receptores. (b) Vista lateral después de una rotación de 90 grados sobre el eje vertical. (c) Comparación de los dominios extracelulares de unión a ligandos que muestra cambios estructurales modestos.

FIGURA 9. Dominio intracelular estabilizado por el Nb80 en comparación con las estructuras inactivas del β_2 AR y la opsina.

(a) Vista lateral del β_2 AR (naranja) con las CDR del Nb80 en azul claro (CDR1) y azul (CDR3) interactuando con el receptor. (b) Vista más de cerca enfocada en las CDR 1 y 3 entrando en el β_2 AR. Se muestran cadenas laterales en los TM3, 5, 6 y 7 a menos de 4 Å de las CDR. El CDR3 más grande penetra 13 Å en el receptor. (c) Interacción del CDR1 y el CDR3 vista desde el lado intracelular. (d) El β_2 ART4L unido a un agonista y estabilizado por el Nb80 (β_2 AR-Nb80) está superpuesto con la estructura inactiva unida al carazolol del β_2 AR-T4L (β_2 AR-Cz). La interacción de bloqueo iónico entre el Asp3.49 y la Arg3.50 del motivo DRY en el TM3 está rota en la estructura β_2 AR-Nb80. El extremo intracelular del TM6 se mueve hacia el exterior y alejándose del núcleo del receptor. La flecha indica un cambio de 11,4 Å en la distancia entre el carbono α del Glu6.30 en las estructuras del β_2 AR-Cz y el β_2 AR-Nb80. Los extremos intracelulares del TM3 y el TM7 se mueven hacia el núcleo 4 y 2,5 Å respectivamente, mientras que el TM5 se mueve hacia el exterior 6Å. (e) La estructura del β_2 AR-Nb80 superpuesta con la estructura de la opsina cristalizada con el péptido C-terminal de la G_i (transducina).

FIGURA 10. Dominio intracelular del β_2 AR estabilizado por el Nb80 en comparación con estructuras de la opsina.

(a) Interacciones entre el β_2 AR y el Nb80. (b) Interacciones entre la opsina y el péptido carboxilo terminal de la transducina.

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

(a) Las interacciones de empaquetamiento que estabilizan el estado inactivo se observan entre la Pro211 en el TM5, la Ile121 en el TM3, la Phe282 en el TM6 y la Asn316 en el TM5. (b) El movimiento hacia el interior del TM5 tras la unión de un agonista interrumpe el empaquetamiento de la Ile121 y la Pro211, dando como resultado un reordenamiento de interacciones entre la Ile121 y la Phe282. Estos cambios contribuyen a una rotación y un movimiento hacia el exterior del TM6 y un movimiento hacia el interior del TM7.

FIGURA 12. Secuencias de aminoácidos de los diferentes nanocuerpos dirigidos contra el β_2 AR. Las secuencias se han alineado usando herramientas de *software* estándar. Las CDR se han definido según la numeración IMGT (Lefranc et al., 2003).

FIGURA 13. Efecto del Nb80 sobre la estabilidad térmica del receptor β_2 AR. Comparación de las curvas de fusión del β_2 AR unido al agonista (isoproterenol) solubilizado con detergente (DDM) en presencia y ausencia de Nb80. La temperatura de fusión aparente para el β_2 AR sin Nb80 es 12,0°C. La temperatura de fusión aparente para el β_2 AR con Nb80 es 24°C.

FIGURA 14. Efecto del Nb80 sobre la agregación inducida por temperatura del receptor β_2 AR.

A. Se calentó β_2 AR solubilizado con detergente (DDM) durante 10 minutos a 50°C en presencia de Nb80 o isoproterenol y la agregación del receptor se analizó por SEC. B. Dependencia de la temperatura del receptor unido a isoproterenol en ausencia de Nb80.

FIGURA 15. El Nb80 tiene poco efecto sobre la unión del β_2 AR al agonista inverso ICI-118,551

El β_2 AR o el β_2 AR-T4L se reconstituyó en partículas de HDL y se realizaron experimentos de unión de competencia de agonista en ausencia o presencia de Nb80. Curvas de unión de ligando para el agonista inverso ICI-118551 en competencia contra el [3H]-dihidroalprenolol ([³H]-DHA) para a, β_2 AR/HDL en ausencia y presencia de Nb80, y b, β_2 AR-T4L/HDL en ausencia y presencia de Nb80.

FIGURA 16. El Nb80 aumenta la afinidad del β_2 AR por los agonistas, pero no por los antagonistas.

Se realizaron experimentos de unión de ligando competitiva sobre membranas comerciales derivadas de células de insecto con β_2 AR en toda su longitud en ausencia o presencia de Nb80. Curvas de desplazamiento de radioligando dependiente de la dosis en presencia de Nb80 y un nanocuerpo irrelevante (Irr Nb) para dos agonistas representativos (isoproterenol, procaterol) y dos antagonistas representativos (ICI-118,551 y carvedilol).

FIGURA 17: Alineamiento de secuencias del β_1 AR humano y el β_2 AR humano.

Los aminoácidos del β_2 -adrenorreceptor que interactúan con el Nb80 en la interfase β_2 AR-Nb80 están subrayados.

FIGURA 18: El Nb80 se une selectivamente a la conformación activa del receptor β_1 AR humano

Curvas de unión de ligando para agonistas y agonistas inversos en competencia contra el [3H]-dihidroalprenolol ([³H]-DHA). A) Unión del agonista isoproterenol (ISO) al β_2 AR en presencia y ausencia de Nb80. B) Unión del agonista inverso ICI-118,551 (ICI) al β_2 AR en presencia y ausencia de Nb80. C) Unión del agonista isoproterenol (ISO) al β_1 AR en presencia y ausencia de Nb80. D) Unión del agonista inverso CGP20712A (CPG) al β_1 AR en presencia y ausencia de Nb80.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**DEFINICIONES**

[0021] La presente invención se describirá con respecto a formas de realización particulares y con referencia a ciertos dibujos, pero la invención no está limitada a los mismos sino solo por las reivindicaciones. Cualquier señal de referencia en las reivindicaciones no debe interpretarse como limitante del alcance. Los dibujos descritos son solo esquemáticos y son no limitativos. En los dibujos, el tamaño de algunos de los elementos puede estar exagerado y no dibujado a escala con fines ilustrativos. Cuando se usa el término "(que) comprende(n)" en la presente descripción y reivindicaciones, no excluye otros elementos o pasos. Cuando se usa un artículo definido o indefinido en referencia a un sustantivo singular, por ejemplo, "una" o "un", "el/la", esto incluye un plural de este sustantivo a menos que se manifieste específicamente otra cosa. Además, los términos primer, segundo, tercer y similares en la descripción y en las reivindicaciones se usan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Debe entenderse que los términos así usados son intercambiables bajo circunstancias apropiadas y que las formas de realización de la invención descritas en la presente son capaces de operar en otras secuencias que se describen o ilustran en la presente.

[0022] A menos que se defina de otro modo en la presente, los términos científicos y técnicos y las frases usadas en conexión con la presente invención deberán tener los significados que se entienden comúnmente por aquellas personas expertas en la materia. Generalmente, las nomenclaturas usadas en conexión con, y las técnicas de biología molecular y celular, la genética y la química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en la presente son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente especificación a menos que se indique lo contrario. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992 y suplementos al 2002).

[0023] El término "dominio de unión a proteínas" se refiere generalmente a cualquier molécula de origen no natural o parte de la misma que sea capaz de unirse a una proteína o péptido usando interacciones intermoleculares específicas. Una variedad de moléculas puede funcionar como dominios de unión a proteínas, incluidas, pero de forma no limitativa, moléculas proteínicas (proteína, péptido, similar a proteína o que contiene proteína), moléculas

de ácido nucleico (ácido nucleico, similar a ácidos nucleicos, que contiene ácido nucleico) y moléculas de carbohidrato (carbohidrato, similar a carbohidratos, que contiene carbohidrato). Una descripción más detallada se puede encontrar adicionalmente en la especificación.

[0024] Como se utiliza en la presente, los términos "polipéptido(s)", "proteína(s)", "péptido(s)" se utilizan de forma intercambiable en la presente y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos codificados y no codificados, aminoácidos modificados química o bioquímicamente o derivatizados y polipéptidos con esqueletos peptídicos modificados.

[0025] Como se utiliza en la presente, los términos "complejo multiproteico" o "complejo proteico" o sencillamente "complejo" se refieren a un grupo de dos o más cadenas polipeptídicas asociadas. Las proteínas en un complejo proteico se enlazan mediante interacciones proteína-proteína no covalentes. La "estructura cuaternaria" es la disposición estructural de las proteínas plegadas asociadas en el complejo proteico. Un "complejo multimérico" se refiere a un complejo proteico tal y como se define en la presente que puede además comprender una molécula no protéica.

[0026] Como se utiliza en la presente, los términos "molécula de ácido nucleico", "polinucleótido", "ácido polinucleico", "ácido nucleico" se utilizan de forma intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los ejemplos no limitativos de polinucleótidos incluyen un gen, un fragmento de un gen, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, regiones de control, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. La molécula de ácido nucleico puede ser lineal o circular.

[0027] Como se utiliza en la presente, el término "ligando" o "ligando del receptor" significa una molécula que se une específicamente a un GPCR, ya sea intracelular o extracelularmente. Un ligando puede ser, sin el fin de ser limitativo, una proteína, un (poli)péptido, un lípido, una molécula pequeña, un andamio de proteína, un ácido nucleico, un ion, un carbohidrato, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, tal como un nanocuerpo (todos tal y como se define en la presente). Un ligando puede ser uno sintético o de origen natural. Un ligando incluye también un "ligando nativo" que es un ligando que es un ligando natural endógeno para un GPCR nativo. Un "modulador" es un ligando que aumenta o reduce la actividad de señalización de un GPCR (es decir, a través de una respuesta intracelular) cuando está en contacto con, por ejemplo, se une a, un GPCR que está expresado en una célula. Este término incluye agonistas, agonistas completos, agonistas parciales, agonistas inversos y antagonistas, de los cuales se puede encontrar una descripción más detallada más adelante en la especificación.

[0028] El término "conformación" o "estado conformacional" de una proteína se refiere generalmente al rango de estructuras que una proteína puede adoptar en cualquier instante de tiempo. Una persona experta en la materia reconocerá que los determinantes de la conformación o estado conformacional incluyen la estructura primaria de una proteína tal y como se refleja en la secuencia de aminoácidos de una proteína (incluidos los aminoácidos modificados) y el entorno que rodea a la proteína. La conformación o estado conformacional de una proteína también se refiere a características estructurales tales como estructuras secundarias proteicas (por ejemplo, hélice α , lámina β , entre otras), la estructura terciaria (por ejemplo, el plegamiento tridimensional de una cadena polipeptídica) y la estructura cuaternaria (por ejemplo, las interacciones de una cadena polipeptídica con otras subunidades proteicas). Las modificaciones postraduccionales y de otro tipo de una cadena polipeptídica tales como la unión de ligando, la fosforilación, la sulfación, la glicosilación o las uniones de grupos hidrofóbicos, entre otras, pueden influir la conformación de una proteína. Además, los factores ambientales, tales como el pH, la concentración de sal, la fuerza iónica y la osmolalidad de la solución circundante, y la interacción con otras proteínas y cofactores, entre otros, pueden afectar a la conformación proteica. El estado conformacional de una proteína se puede determinar o por ensayo funcional para la actividad o la unión a otra molécula o por medio de métodos físicos tales como la cristalografía de rayos X, la RMN o el marcaje de espín, entre otros métodos. Para una discusión general de la conformación y estados conformacionales proteicos, refiérase a Cantor y Schimmel, Biophysical Chemistry, Part I: The Conformation of Biological Macromolecules, W.H. Freeman and Company, 1980, y Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties, W.H. Freeman and Company, 1993. Un "estado conformacional específico" es cualquier subconjunto del rango de conformaciones o estados conformacionales que puede adoptar una proteína.

[0029] Una "conformación funcional" o un "estado conformacional funcional", como se utiliza en la presente, se refiere al hecho de que las proteínas poseen diferentes estados conformacionales con un rango dinámico de actividad, en particular que varía desde ninguna actividad hasta actividad máxima. Debe quedar claro que "un estado conformacional funcional" pretende cubrir cualquier estado conformacional de un GPCR, con cualquier actividad, incluida ninguna actividad; y no pretende cubrir los estados desnaturalizados de las proteínas.

[0030] Como se utiliza en la presente, los términos "región determinante de la complementariedad" o "CDR" en el contexto de los anticuerpos se refieren a regiones variables de cadenas o H (pesadas) o L (ligeras) (también abreviadas como VH y VL, respectivamente) y contiene las secuencias de aminoácidos capaces de unirse específicamente a dianas antigénicas. Estas regiones CDR explican la especificidad básica del anticuerpo por una estructura determinante antigénica particular. Tales regiones se conocen también como "regiones hipervariables". Las CDR representan extensiones no contiguas de aminoácidos en las regiones variables, pero se ha descubierto que, independientemente de las especies, las ubicaciones posicionales de estas secuencias de aminoácidos críticas en las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras tienen ubicaciones similares en las secuencias de aminoácidos de las cadenas variables. Las cadenas variables pesadas y ligeras de todos los anticuerpos canónicos tiene cada una 3 regiones CDR, cada una no contigua a las otras (denominadas L1, L2, L3, H1, H2, H3) para las cadenas ligera (L) y pesada (H) respectivas. Los nanocuerpos, en particular, comprenden generalmente una única cadena de aminoácidos que se puede considerar que comprende 4 "secuencias o regiones marco" o FR y 3 "regiones determinantes de la complementariedad" o CDR. Los nanocuerpos tienen 3 regiones CDR, cada una no contigua a las otras (denominadas CDR1, CDR2, CDR3). La delineación de las secuencias FR y CDR se basa en el sistema de numeración única IMGT para los dominios V y los dominios de tipo V (Lefranc et al. 2003).

[0031] Un "epítipo", como se utiliza en la presente, se refiere a un determinante antigénico de un polipéptido. Un epítipo podría comprender 3 aminoácidos en una conformación espacial, que es única para el epítipo. Generalmente, un epítipo consiste en al menos 4, 5, 6, 7 tales aminoácidos y, más normalmente, consiste en al menos 8, 9, 10 tales aminoácidos. Los métodos de determinación de la conformación espacial de los aminoácidos se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional.

[0032] Un "epítipo conformacional", como se utiliza en la presente, se refiere a un epítipo que comprende aminoácidos en una conformación espacial que es única para una conformación tridimensional plegada del polipéptido. Generalmente, un epítipo conformacional consiste en aminoácidos que son discontinuos en la secuencia lineal que concurren en la estructura plegada de la proteína. Sin embargo, un epítipo conformacional también puede consistir en una secuencia lineal de aminoácidos que adopta una conformación que es única para una conformación tridimensional plegada del polipéptido (y no presente en un estado desnaturalizado). En complejos multiproteicos, los epítipos conformacionales consisten en aminoácidos que son discontinuos en las secuencias lineales de uno o más polipéptidos que concurren tras el plegamiento de los diferentes polipéptidos plegados y su asociación en una estructura cuaternaria única. De forma similar, los epítipos conformacionales también pueden consistir aquí en una secuencia lineal de aminoácidos de uno o más polipéptidos que concurren y adoptan una conformación que es única para la estructura cuaternaria.

[0033] El término "especificidad", como se utiliza en la presente, se refiere a la capacidad de un dominio de unión a proteínas, en particular una inmunoglobulina o un fragmento de una inmunoglobulina, tal como un nanocuerpo, para unirse preferentemente a un antígeno, frente a un antígeno diferente, y no implica necesariamente una alta afinidad.

[0034] El término "afinidad", como se utiliza en la presente, se refiere al grado con el que un dominio de unión a proteínas, en particular una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, o un fragmento de una inmunoglobulina, tal como un nanocuerpo, se une a un antígeno para desplazar el equilibrio del antígeno y el dominio de unión a proteínas hacia la presencia de un complejo formado por su unión. Así, por ejemplo, cuando un antígeno y un (fragmento de) anticuerpo se combinan en una concentración relativamente igual, un (fragmento de) anticuerpo de alta afinidad se unirá al antígeno disponible para desplazar el equilibrio hacia una alta concentración del complejo resultante. La constante de disociación se usa comúnmente para describir la afinidad entre el dominio de unión a proteínas y la diana antigénica. Típicamente, la constante de disociación es inferior a 10^{-5} M. Preferiblemente, la constante de disociación es inferior a 10^{-6} M, más preferiblemente, inferior a 10^{-7} M. Más preferiblemente, la constante de disociación es inferior a 10^{-8} M.

[0035] Los términos "se une(n) específicamente" y "unión específica", como se utilizan en la presente, generalmente se refieren a la capacidad de un dominio de unión a proteínas, en particular una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, o un fragmento de una inmunoglobulina, tal como un nanocuerpo, para unirse preferentemente a un antígeno particular que está presente en una mezcla homogénea de diferentes antígenos. En ciertas formas de realización, una interacción de unión específica discriminará entre antígenos deseables e indeseables en una muestra, en algunas formas de realización más de aproximadamente de 10 a 100 veces o más (por ejemplo, más de aproximadamente 1000 o 10.000 veces). En el contexto del espectro de estados conformacionales de los GPCR, los términos se refieren particularmente a la capacidad de un dominio de unión a proteínas (como se ha definido en la presente) de reconocer y/o unirse preferentemente a un estado conformacional particular de un GPCR en comparación con otro estado conformacional. Por ejemplo, un dominio de unión a proteínas selectiva de estado activo se unirá preferentemente a un GPCR en un estado conformacional activo y no se unirá o lo hará en menor medida a un GPCR en un estado conformacional inactivo, y tendrán así una afinidad más alta para dicho estado conformacional activo. Los términos "se unen específicamente", "se unen selectivamente", "se unen

preferentemente" y los equivalentes gramaticales de los mismos, se utilizan de forma intercambiable en la presente. Los términos "específico(s) conformacional(es)" o "selectivo(s) conformacional(es)" también se usan de forma intercambiable en la presente.

5 [0036] Un "antígeno", como se utiliza en la presente, significa una molécula capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un animal. En el contexto del espectro de estados conformacionales de un GPCR, dicha molécula comprende un epítipo conformacional de un GPCR en un estado conformacional particular que no se forma o es menos accesible en otro estado conformacional de dicho GPCR.

10 [0037] Una "delección" se define aquí como un cambio en cualquier secuencia de aminoácidos o nucleótidos donde uno o más residuos de aminoácido o nucleótido, respectivamente, están ausentes en comparación con una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos de un polipéptido o un ácido nucleico parental. En el contexto de una proteína, una delección puede implicar la delección de aproximadamente 2, aproximadamente 5, aproximadamente 10, hasta aproximadamente 20, hasta aproximadamente 30 o hasta aproximadamente 50 o más aminoácidos. Una proteína o un fragmento de la misma puede contener más de una delección. En el contexto de un GPCR, una delección también puede ser una delección de bucle o una delección N- y/o C-terminal.

15 [0038] Una "inserción" o "adición" es ese cambio en una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que ha resultado en la adición de uno o más residuos de aminoácido o nucleótido, respectivamente, en comparación con una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos de una proteína parental. "Inserción" generalmente se refiere a la adición a uno o más residuos de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos de un polipéptido, mientras que la "adición" puede ser una inserción o referirse a residuos de aminoácidos añadidos en un extremo N- o C-terminal, o ambos extremos. En el contexto de una proteína o un fragmento de la misma, una inserción o adición es normalmente de aproximadamente 1, aproximadamente 3, aproximadamente 5, aproximadamente 10, hasta aproximadamente 20, hasta aproximadamente 30 o hasta aproximadamente 50 o más aminoácidos. Una proteína o fragmento de la misma puede contener más de una inserción.

20

25 [0039] Una "sustitución", como se utiliza en la presente, resulta de la sustitución de uno o más aminoácidos o nucleótidos por aminoácidos o nucleótidos diferentes, respectivamente, en comparación con una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos de una proteína parental o un fragmento de la misma. Se entiende que una proteína o un fragmento de la misma puede tener sustituciones de aminoácidos conservadoras que no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la actividad de la proteína. Por sustituciones conservadoras se entienden combinaciones tales como gly, ala; val, ile, leu, met; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; cys, met; y phe, tyr, trp.

30

[0040] "Cristal" o "estructura cristalina", como se utiliza en la presente, se refiere a un material sólido, cuyos átomos, moléculas o iones constituyentes se disponen en un patrón repetitivo ordenado que se extiende en las tres dimensiones espaciales. El proceso de formación de una estructura cristalina a partir de un fluido o de materiales disueltos en el fluido se conoce a menudo como "cristalización" o "cristalogénesis". Los cristales de proteína se hacen crecer casi siempre en solución. El método más común es reducir la solubilidad de sus moléculas componentes gradualmente. El crecimiento de cristales en solución se caracteriza por dos pasos: nucleación de un cristalito microscópico (posiblemente con solo 100 moléculas), seguido del crecimiento de este cristalito, idealmente hasta un cristal de calidad de difracción.

35

40 [0041] La "cristalografía de rayos X", como se utiliza en la presente, es un método de determinación de la disposición de los átomos en un cristal, donde un rayo de rayos X alcanza un cristal y se difracta en muchas direcciones específicas. A partir de los ángulos e intensidades de estos rayos difractados, un cristalógrafo puede producir una imagen tridimensional de la densidad de electrones en el cristal. A partir de esta densidad electrónica, se pueden determinar las posiciones medias de los átomos en el cristal, así como sus enlaces químicos, su desorden y otra información variada.

45 [0042] El término "coordenadas atómicas", como se utiliza en la presente, se refiere a un conjunto de coordenadas tridimensionales para los átomos en una estructura molecular. En una forma de realización, las coordenadas atómicas se obtienen usando la cristalografía de rayos X según métodos bien conocidos por las personas expertas en la técnica biofísica. Descrito brevemente, se pueden obtener patrones de difracción de rayos X difractando rayos X desde un cristal. Los datos de difracción se utilizan para calcular un mapa de densidad electrónica de la célula unitaria que comprende el cristal; dichos mapas se utilizan para establecer las posiciones de los átomos (es decir, las coordenadas atómicas) en la célula unitaria. Aquellas personas expertas en la técnica entienden que un conjunto de coordenadas estructurales determinadas por cristalografía de rayos X contiene errores estándar. En otras formas de realización, se pueden obtener coordenadas atómicas usando otros métodos de determinación de la estructura biofísicos experimentales que pueden incluir los métodos de difracción electrónica (también conocida como

50

55 cristalografía electrónica) y de resonancia magnética nuclear (RMN). Todavía en otras formas de realización, se pueden obtener coordenadas atómicas usando herramientas de modelado molecular que se pueden basar en uno

o más de entre algoritmos de plegamiento de proteínas *ab initio*, minimización de energía y modelado basado en la homología. Estas técnicas son bien conocidas por las personas expertas en la materia en las técnicas biofísica y bioinformática.

[0043] "Resolución de la estructura" como se utiliza en la presente se refiere a determinar la disposición de los átomos o las coordenadas atómicas de una proteína, y se hace a menudo mediante un método biofísico, tal como la cristalografía de rayos X.

[0044] El término "compuesto" o "compuesto de prueba" o "compuesto candidato" o "compuesto candidato a fármaco" como se utiliza en la presente describe cualquier molécula, ya sea de origen natural o sintética, que se evalúa en un ensayo, tal como un ensayo de cribado o ensayo de descubrimiento de fármacos. Como tal, estos compuestos comprenden compuestos orgánicos o inorgánicos. Los compuestos incluyen polinucleótidos, lípidos o análogos de hormonas o que se caracterizan por pesos moleculares bajos. Otros compuestos de prueba orgánicos biopoliméricos incluyen péptidos pequeños o moléculas similares a péptidos (peptidomiméticos) que comprenden de aproximadamente 2 a aproximadamente 40 aminoácidos y polipéptidos más grandes que comprenden de aproximadamente 40 a aproximadamente 500 aminoácidos, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o conjugados de anticuerpos. Los compuestos de prueba también pueden ser andamios de proteína. Con fines de alto rendimiento, se pueden usar bibliotecas de compuestos de prueba, tales como bibliotecas combinatorias o aleatorizadas que proporcionan un rango suficiente de diversidad. Los ejemplos incluyen, pero de forma no limitativa, bibliotecas de compuestos naturales, bibliotecas de compuestos alostéricos, bibliotecas de péptidos, bibliotecas de fragmentos de anticuerpos, bibliotecas de compuestos sintéticos, bibliotecas basadas en fragmentos, bibliotecas de expresión en fagos y similares. Se puede encontrar una descripción más detallada más adelante en la especificación.

[0045] Como se utiliza en la presente, los términos "determinación", "medición", "valoración", "monitorización" y "evaluación" se usan de forma intercambiable e incluyen tanto determinaciones cuantitativas como cualitativas.

[0046] El término "biológicamente activo", con respecto a un GPCR, se refiere a un GPCR que tiene una función bioquímica (por ejemplo, una función de unión, una función de transducción de señales o una capacidad para cambiar la conformación como resultado de la unión de un ligando) de un GPCR de origen natural.

[0047] Los términos "cantidad terapéuticamente eficaz", "dosis terapéuticamente efectiva" y "cantidad eficaz", como se utiliza en la presente, significan la cantidad necesaria para conseguir el resultado o los resultados deseado(s).

[0048] El término "farmacéuticamente aceptable", como se utiliza en la presente, significa un material que no es indeseable biológicamente o de otro modo, es decir, el material se puede administrar a un individuo junto con el compuesto sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de una manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0049] La información estructural sobre los GPCR proporcionará comprensión sobre los cambios estructurales, funcionales y bioquímicos implicados en la transferencia de señales desde el receptor hasta las proteínas de interacción intracelulares (proteínas G, β -arrestinas, etc.) y delineará maneras de interferir con estas interacciones farmacológicamente pertinentes. Los esfuerzos para obtener y cristalizar los GPCR son por lo tanto de gran importancia. Sin embargo, este es un esfuerzo particularmente difícil debido a los desafíos bioquímicos en el trabajo con los GPCR y la inestabilidad inherente de estos complejos en soluciones detergentes. Además, la flexibilidad conformacional intrínseca de los GPCR complica los análisis estructurales de alta resolución de los GPCR solos porque el crecimiento de cristales de calidad de difracción requiere proteínas conformacionalmente homogéneas estables (Kobilka et al. 2007). La presente descripción se refiere a nuevas herramientas experimentales y analíticas para capturar o "congelar" estados conformacionales funcionales de un GPCR de interés, en particular su estado conformacional activo, que permitan el análisis estructural y funcional del GPCR, incluido el análisis estructural de alta resolución y muchas aplicaciones derivadas del mismo.

[0050] En la presente se describe un dominio de unión a proteínas que es capaz de unirse específicamente a un estado conformacional funcional de un GPCR.

[0051] El dominio de unión a proteínas puede ser cualquier molécula de origen no natural o parte de la misma (como se ha definido anteriormente) que sea capaz de unirse específicamente a un estado conformacional funcional de un GPCR diana. Preferiblemente, los dominios de unión a proteínas descritos en la presente son andamios de proteína. El término "andamio de proteína" se refiere generalmente a unidades de plegamiento que forman estructuras, particularmente estructuras de proteínas o péptidos, que comprenden marcos para la unión de otra

molécula, por ejemplo, una proteína (véase, por ejemplo, Skerra, J. 2000, para una revisión). Un dominio de unión a proteínas puede derivar de una molécula de origen natural, por ejemplo, de componentes del sistema inmunitario innato o adaptativo, o puede diseñarse totalmente de manera artificial. Un dominio de unión a proteínas puede estar basado en inmunoglobulinas o puede estar basado en dominios presentes en proteínas, incluidos, pero de forma no limitativa, proteínas microbianas, inhibidores de proteasa, toxinas, fibronectina, lipocalinas, proteínas de superhélices antiparalelas monocatenarias o proteínas de motivos de repetición. Los ejemplos de dominios de unión a proteínas que se conocen en la técnica incluyen, pero de forma no limitativa: anticuerpos, anticuerpos de cadena pesada (hcAb), anticuerpos de dominio único (sdAb), minicuerpos, el dominio variable derivado de anticuerpos de cadena pesada de camélidos (VHH o nanocuerpos), el dominio variable de los nuevos receptores de antígenos derivados de anticuerpos de tiburón (VNAR), cuerpos alfa, proteína A, proteína G, dominios de repetición de anquirina diseñados (DARPin), repeticiones de fibronectina de tipo III, anticalinas, knotinas, dominios CH2 diseñados (nanoanticuerpos), péptidos y proteínas, lipopéptidos (por ejemplo, pepducinas), ADN y ARN (véase, por ejemplo, Gebauer y Skerra, 2009; Skerra, 2000; Starovasnik et al., 1997; Binz et al., 2004; Koide et al., 1998; Dimitrov, 2009; Nygren et al. 2008; WO2010066740). Frecuentemente, cuando se genera un tipo particular de dominio de unión a proteínas usando métodos de selección, se utilizan bibliotecas combinatorias que comprenden una secuencia de consenso o marco que contiene residuos de interacción potencial aleatorizados para cribar la unión a una molécula de interés, tal como una proteína.

[0052] Los "receptores acoplados a proteínas G" o "GPCR", como se utiliza en la presente, son polipéptidos que comparten un motivo estructural común, con siete regiones de entre 22 a 24 aminoácidos hidrofóbicos que forman siete hélices alfa, cada una de las cuales abarca la membrana. Cada extensión está identificada por un número, es decir, transmembrana-1 (TM1), transmembrana-2 (TM2), etc. Las hélices transmembranarias están unidas por regiones de aminoácidos entre transmembrana-2 y transmembrana-3, transmembrana-4 y transmembrana-5, y transmembrana-6 y transmembrana-7 en el lado exterior, o "extracelular", de la membrana celular, conocidas como regiones "extracelulares" 1, 2 y 3 (EC1, EC2 y EC3), respectivamente. Las hélices transmembranarias también están unidas por regiones de aminoácidos entre transmembrana-1 y transmembrana-2, transmembrana-3 y transmembrana-4, y transmembrana-5 y transmembrana-6 en el lado interior, o "intracelular", de la membrana celular, conocidas como regiones "intracelulares" 1, 2 y 3 (IC1, IC2 e IC3), respectivamente. El extremo "carboxilo" ("C") del receptor se extiende en el espacio intracelular en la célula, y el extremo "amino" ("N") del receptor se extiende en el espacio extracelular en el exterior de la célula. Cualquiera de estas regiones es identificable fácilmente por análisis de la secuencia de aminoácidos primaria de un GPCR.

[0053] La estructura y la clasificación de los GPCR son generalmente bien conocidas en la técnica y se puede encontrar una discusión adicional de los GPCR en Probst et al. 1992; Marchese et al. 1994; Lagerström y Schiöth, 2008; Rosenbaum et al. 2009; y los siguientes libros: Jurgen Wess (Ed) Structure-Function Analysis of G Protein-Coupled Receptors publicado por Wiley-Liss (1ª edición; 15 de octubre de 1999); Kevin R. Lynch (Ed) Identification and Expression of G Protein-Coupled Receptors publicado por John Wiley & Sons (marzo de 1998) y Tatsuya Haga (Ed), G Protein-Coupled Receptors, publicado por CRC Press (24 de septiembre de 1999); y Steve Watson (Ed) G-Protein Linked Receptor Factsbook, publicado por Academic Press (1ª edición; 1994).

[0054] Los GPCR se pueden agrupar en función de la homología de secuencias en varias familias distintas. Aunque todos los GPCR tienen una arquitectura similar de siete α -hélices que abarcan la membrana, las diferentes familias dentro de esta clase de receptores no muestran ninguna homología de secuencia entre sí, sugiriendo así que la similitud de su estructura de dominio transmembranario puede definir requisitos funcionales comunes. Una visión exhaustiva del repertorio de GPCR fue posible cuando se volvió disponible el anteproyecto del genoma humano. Fredriksson y sus compañeros dividieron 802 GPCR humanos en familias en función de criterios filogenéticos. Esto mostró que la mayor parte de los GPCR humanos se pueden encontrar en cinco familias principales, denominadas glutamato, rodopsina, adhesión, Frizzled/Taste2 y secretina (Fredriksson et al., 2003).

[0055] El dominio de unión a proteínas se dirige preferiblemente contra o es capaz de unirse específicamente a un estado conformacional funcional de un GPCR, donde dicho GPCR se elige del grupo que comprende un GPCR de la familia de los GPCR de glutamato, un GPCR de la familia de los GPCR de rodopsina, un GPCR de la familia de los GPCR de adhesión, un GPCR de la familia Frizzled/Taste2 de los GPCR y un GPCR de la familia de los GPCR de secretina. Preferiblemente, el GPCR es una proteína de mamíferos o una proteína vegetal o una proteína microbiana o una proteína vírica o una proteína de insecto. Aún más preferiblemente, el GPCR es una proteína humana.

[0056] Los miembros de la familia de rodopsina (correspondientes a la clase A (Kolakowski, 1994) o la clase 1 (Foord et al (2005) en los sistemas de clasificación más antiguos) solo tienen bucles extracelulares pequeños y la interacción de los ligandos ocurre con residuos en la hendedura transmembranaria. Este es de lejos el grupo más grande (>90% de los GPCR) y contiene receptores para odorantes, moléculas pequeñas tales como catecolaminas y aminas, (neuro)péptidos y hormonas glicoproteicas. La rodopsina, un representante de esta familia, es el primer GPCR para el que se ha resuelto la estructura (Palczewski et al., 2000). El β_2 AR, el primer receptor que interactúa con un ligando difusible para el que se ha resuelto la estructura (Rosenbaum et al, 2007) también pertenece a esta

familia. A partir de análisis filogenéticos, los receptores GPCR de clase B o clase 2 (Foord et al, 2005) se han subdividido recientemente en dos familias: adhesión y secretina (Fredriksson et al., 2003). Los receptores de adhesión y secretina se caracterizan por un dominio extracelular aminoterminal relativamente largo implicado en la unión de ligando. Poco se conoce acerca de la orientación de los dominios transmembranarios, pero es probablemente bastante diferente de la de la rodopsina. Los ligandos para estos GPCR son hormonas, tales como el glucagón, la secretina, la hormona de liberación de gonadotropina y la hormona paratiroidea. Los receptores de la familia de glutamato (receptores de clase C o clase 3) también tienen un dominio extracelular grande, que funciona como una "Venus atrapamoscas", ya que puede abrirse y cerrarse con el agonista unido en el interior. Miembros de la familia son el glutamato metabotrópico, los receptores sensores de Ca^{2+} y los de ácido γ -aminobutírico (GABA)-B.

[0057] Los GPCR incluyen, sin limitación, receptores olfativos de serotonina, receptores de hormonas glicoproteicas, receptores de quimiocinas, receptores de adenosina, receptores de aminas biogénicas, receptores de melanocortina, receptores de neuropéptidos, receptores quimiotácticos, receptores de somatostatina, receptores opioides, receptores de melatonina, receptores de calcitonina, receptores PTH/PTHrP, receptores de glucagón, receptores de secretina, receptores de latrotoxina, receptores de glutamato metabotrópico, receptores de calcio, receptores GABA-B, receptores de feromonas, los receptores activados por proteasa, las rodopsinas y otros receptores de siete segmentos transmembranarios acoplados a proteínas G. Los GPCR incluyen también estos receptores GPCR asociados entre sí como dímeros homoméricos o heteroméricos o como oligómeros de orden superior. Las secuencias de aminoácidos (y las secuencias de nucleótidos de los ADNc que las codifican) de los GPCR están fácilmente disponibles, por ejemplo, por referencia a GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>).

[0058] El GPCR se puede elegir del grupo que comprende los receptores adrenérgicos, preferiblemente los receptores α adrenérgicos, tales como los receptores α_1 adrenérgicos y los receptores α_2 adrenérgicos, y los receptores β adrenérgicos, tales como los receptores β_1 adrenérgicos, los receptores β_2 adrenérgicos y los receptores β_3 adrenérgicos; o del grupo que comprende los receptores muscarínicos, preferiblemente los receptores muscarínicos M1, los receptores muscarínicos M2, los receptores muscarínicos M3, los receptores muscarínicos M4 y los receptores muscarínicos M5; o del grupo de los receptores de angiotensina, preferiblemente el receptor de la angiotensina II de tipo 1, el receptor de la angiotensina II de tipo 2 y otros receptores de la angiotensina II atípicos; todos los cuales se conocen en la técnica.

[0059] Un GPCR, como se utiliza en la presente, puede ser cualquier polipéptido de origen natural o de origen no natural (es decir, alterado por el ser humano). El término "de origen natural" en referencia a un GPCR significa un GPCR que se produce naturalmente (por ejemplo y sin limitación, por un mamífero, más específicamente por un humano, o por un virus, o por una planta, o por un insecto, entre otros). Tales GPCR se encuentran en la naturaleza. El término "de origen no natural" en referencia a un GPCR significa un GPCR que no es natural. Los GPCR de tipo salvaje que se han hecho constitutivamente activos a través de la mutación y variantes de GPCR naturales son ejemplos de GPCR de origen no natural. Un GPCR de origen no natural puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% idéntica a, al menos un 90% idéntica a, al menos un 95% idéntica a o al menos un 99% idéntica a un GPCR natural. Tomando el receptor β_2 -adrenérgico como un ejemplo no limitativo particular de un GPCR dentro del alcance de la presente invención, debería quedar claro a partir de lo anterior que, además del receptor β_2 adrenérgico humano (por ejemplo, la secuencia descrita por el número de registro de Genbank NP_000015), también puede emplearse el receptor β_2 adrenérgico de ratón (por ejemplo, como se describe por el n.º de registro de Genbank NM 007420) u otro receptor β_2 adrenérgico de mamífero. Además, el término se destina a abarcar variantes polimórficas de tipo salvaje y ciertas otras variantes activas del receptor β_2 adrenérgico de una especie particular. Por ejemplo, un "receptor β_2 adrenérgico humano" tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95% idéntica a (por ejemplo, al menos un 95% o al menos un 98% idéntica a) el " β_2 adrenergoreceptor humano" de origen natural con el número de registro de Genbank NP_000015. Además, se apreciará que la presente invención prevé también GPCR con una delección de bucle, o una delección N- y/o C-terminal, o una sustitución, o una inserción o adición en relación con su secuencia de aminoácidos o nucleótidos, o cualquier combinación de los mismos (como se ha definido anteriormente, y véase también la sección de Ejemplos). Se espera además que los dominios de unión a proteínas descritos en la presente serán generalmente capaces de unirse a todos los análogos de origen natural o sintéticos, variantes, mutantes, alelos de dicho GPCR.

[0060] Se pueden usar varios métodos para determinar la unión específica entre el dominio de unión a proteínas y un GPCR diana, incluidos, por ejemplo, ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA), ensayos de resonancia de plasmón de superficie, expresión en fagos y similares, que son práctica común en la técnica, por ejemplo, discutido en Sambrook et al. (2001), Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Se apreciará que, para este fin, a menudo se usará un único marcador o etiqueta, tal como un marcador peptídico, un marcador de ácido nucleico, un marcador químico, un marcador fluorescente o un marcador de radiofrecuencia, como se describe más adelante en la presente.

[0061] Debe quedar claro que los GPCR son proteínas de membrana conformacionalmente complejas que exhiben un comportamiento funcional de espectro en respuesta a ligandos naturales y sintéticos. La definición de la vía

desde la unión de un agonista hasta la activación de la proteína requerirá una combinación de estructuras cristalinas de diferentes estados conformacionales del receptor bajo investigación en complejo con varios ligandos naturales o sintéticos (incluidas estructuras de estados activos unidos a un agonista y complejos GPCR-proteína G), que proporcionarán instantáneas a lo largo de la vía de activación.

[0062] Así, el dominio de unión a proteínas descrito en la presente es preferiblemente capaz de estabilizar, o de otro modo, aumentar la estabilidad de un estado conformacional funcional particular de un GPCR. Preferiblemente, el dominio de unión a proteínas es capaz de inducir la formación de un estado conformacional funcional en un GPCR tras la unión a dicho GPCR. Dicho estado de conformación funcional de dicho GPCR puede ser un estado conformacional basal o un estado conformacional activo o un estado conformacional inactivo. Preferiblemente, el dominio de unión a proteínas es capaz de estabilizar un GPCR en su estado conformacional activo y/o es capaz de forzar al GPCR a adoptar su estado conformacional activo tras la unión.

[0063] La expresión "inducir" o "forzar" o "bloquear" o "atrapar" o "fijar" o "congelar" con respecto a un estado conformacional funcional de un GPCR (como se define en la presente), como se utiliza en la presente, se refiere a la retención o el mantenimiento de un GPCR en un subconjunto de las posibles conformaciones que podría de otro modo asumir, debido a los efectos de la interacción del GPCR con el dominio de unión a proteínas descrito en la presente. Por consiguiente, una proteína que está "conformacionalmente atrapada" o "conformacionalmente fija" o "conformacionalmente bloqueada" o "conformacionalmente congelada", como se utiliza en la presente, es una que se mantiene en un subconjunto de las posibles conformaciones que podría de otro modo asumir, debido a los efectos de la interacción del GPCR con el dominio de unión a proteínas descrito en la presente. Dentro de este contexto, un dominio de unión a proteínas que se une específica o selectivamente a una conformación o estado conformacional específico de una proteína se refiere a un dominio de unión a proteínas que se une con una afinidad más alta a una proteína en un subconjunto de conformaciones o estados conformacionales que a otras conformaciones o estados conformacionales que la proteína puede asumir. Una persona experta en la materia reconocerá que los dominios de unión a proteínas que se unen específica o selectivamente a una conformación o estado conformacional específico de una proteína estabilizarán esta conformación o estado conformacional específico.

[0064] El término "un estado conformacional funcional", como se utiliza en la presente, se refiere al hecho de que las proteínas, en particular las proteínas de membrana tales como los GPCR, poseen muchos estados conformacionales diferentes que tienen un rango dinámico de actividad, en particular que varía desde ninguna actividad hasta actividad máxima (revisado en Kobilka y Deupi, 2007). Debe quedar claro que "un estado conformacional funcional" no pretende cubrir los estados desnaturalizados de las proteínas. La versatilidad funcional de los GPCR está intrínsecamente acoplada a la flexibilidad de estas proteínas, dando como resultado tal espectro de conformaciones. El panorama energético conformacional está intrínsecamente acoplado a tales factores como la presencia de ligandos unidos (moléculas efectoras, agonistas, antagonistas, agonistas inversos...), el entorno lipídico o la unión de proteínas de interacción. Por ejemplo, un "estado conformacional basal" se puede definir como un estado de baja energía del receptor en ausencia de un ligando (como se ha definido anteriormente, por ejemplo, moléculas efectoras, agonistas, antagonistas, agonistas inversos). La probabilidad de que una proteína experimente una transición a otro estado conformacional es una función de la diferencia de energía entre los dos estados y la altura de la barrera de energía entre los dos estados. En el caso de una proteína receptora, tal como un GPCR, la energía de unión de ligando se puede usar ya sea para alterar la barrera de energía entre los dos estados o para cambiar los niveles de energía relativos entre los dos estados, o ambos. El cambio de la barrera de energía tendría un efecto sobre la tasa de transición entre los dos estados, mientras que el cambio de los niveles de energía tendría un efecto sobre la distribución del equilibrio de los receptores en dos estados. La unión de un agonista o agonista parcial bajaría la barrera de energía y/o reduciría la energía del estado conformacional más activo con respecto al estado conformacional inactivo. Un agonista inverso aumentaría la barrera de energía y/o reduciría la energía de la "conformación de estado inactivo" con respecto a la "conformación activa". El acoplamiento del receptor a su proteína G podría alterar adicionalmente el panorama energético. Las actividades de las proteínas de membrana integrales, incluidos los GPCR, se ven afectadas también por las estructuras de las moléculas lipídicas que las rodean en la membrana. Las proteínas de membrana no son entidades rígidas y se deforman para asegurar un buen emparejamiento hidrofóbico con la bicapa lipídica circundante. Un parámetro importante es el grosor hidrofóbico de la bicapa lipídica, definido por las longitudes de las cadenas acílicas grasas de los lípidos. Además, es posible que la estructura de la región del grupo de cabeza de los lípidos sea importante en la definición de las estructuras de aquellas partes de una proteína de membrana que se sitúan en la región del grupo de cabeza de los lípidos. Entre otros lípidos, la palmitoilación y la unión de colesterol a los GPCR también pueden jugar un papel estructural dentro de los receptores monoméricos y contribuir a la formación/estabilización de oligómeros de receptores (Lee 2004; Chini y Parenti 2009).

[0065] Los "ligandos del receptor", o sencillamente "ligandos", como se ha definido anteriormente, pueden ser ligandos "ortoestéricos" (tanto naturales como sintéticos), lo que significa que se unen al sitio activo del receptor y se clasifican además según su eficacia o, en otras palabras, el efecto que tienen en la señalización del receptor a través de una vía específica. Como se utiliza en la presente, un "agonista" se refiere a un ligando que, al unirse a

un receptor, aumenta la actividad de señalización del receptor. Los agonistas completos son capaces de una estimulación máxima del receptor; los agonistas parciales son incapaces de provocar la actividad completa incluso en concentraciones de saturación. Los agonistas parciales pueden funcionar también como "bloqueantes" previniendo la unión de agonistas más robustos. Un "antagonista" se refiere a un ligando que se une a un receptor sin estimular ninguna actividad. Un "antagonista" se conoce también como un "bloqueante" debido a su capacidad para evitar la unión de otros ligandos y, por lo tanto, bloquear la actividad inducida por agonistas. Además, un "agonista inverso" se refiere a un antagonista que, además de bloquear los efectos de los agonistas, reduce la actividad basal o constitutiva de los receptores por debajo de la del receptor sin ligando.

[0066] La visión canónica de cómo regulan los GPCR la fisiología celular es que la unión de ligandos (tales como hormonas, neurotransmisores o estímulos sensoriales) estabiliza un estado conformacional activo del receptor, permitiendo así las interacciones con proteínas G heterotriméricas. Además de interactuar con las proteínas G, los GPCR unidos a un agonista se asocian con quinasas de GPCR (GRK), lo que conduce a la fosforilación del receptor. Un resultado común de la fosforilación de los GPCR por las GRK es una reducción en las interacciones de los GPCR con las proteínas G y un aumento en las interacciones de los GPCR con arrestinas, que interceptan estéricamente la señalización de proteínas G más allá, dando como resultado la desensibilización del receptor. Debido a que las β -arrestinas desactivan las señales de las proteínas G, pueden iniciar simultáneamente un segundo conjunto paralelo de cascadas de señales, tal como la vía de las MAPK. Los GPCR se asocian también con varias proteínas fuera de las familias de las proteínas generales que interactúan con GPCR (proteínas G, GRK, arrestinas y otros receptores). Estas parejas selectivas de GPCR pueden mediar la señalización de GPCR, organizar la señalización de GPCR a través de proteínas G, dirigir el tráfico de GPCR, anclar los GPCR en áreas subcelulares particulares y/o influenciar la farmacología de los GPCR (Ritter y Hall 2009). A este respecto, los ligandos, como se utiliza en la presente, también pueden ser "ligandos sesgados" con la capacidad para estimular selectivamente un subconjunto de actividades de señalización de un receptor, por ejemplo, la activación selectiva de la función de las proteínas G o las β -arrestinas. Tales ligandos se conocen como "ligandos sesgados", "agonistas sesgados" o "agonistas funcionalmente selectivos". Más particularmente, el sesgo del ligando puede ser un sesgo imperfecto caracterizado por una estimulación por el ligando de múltiples actividades del receptor con diferentes eficacias relativas para diferentes señales (selectividad no absoluta) o puede ser un sesgo perfecto caracterizado por una estimulación por el ligando de una actividad del receptor sin ninguna estimulación de otra actividad del receptor conocida.

[0067] Las actividades de señalización de los GPCR (y, por tanto, su comportamiento conformacional) también pueden verse afectadas por la unión de otro tipo de ligandos conocidos como reguladores alostéricos. Los "reguladores alostéricos" o, de otro modo, los "moduladores alostéricos", los "ligandos alostéricos" o las "moléculas efectoras" se unen en un sitio alostérico de un GPCR (es decir, un sitio regulador físicamente distinto del sitio activo de la proteína). A diferencia de los ligandos ortoestéricos, los moduladores alostéricos son no competitivos, porque se unen a receptores en un sitio diferente y modifican la función del receptor incluso si el ligando endógeno también se está uniendo. A causa de esto, los moduladores alostéricos no se limitan sencillamente a activar o desactivar un receptor, de la manera que lo hacen la mayoría de fármacos. En su lugar, actúan más como un conmutador más débil, ofreciendo un control sobre la intensidad de activación o desactivación, mientras que permiten que el cuerpo retenga su control natural sobre la activación del receptor de iniciación. Los reguladores alostéricos que mejoran la actividad de la proteína se denominan en la presente "activadores alostéricos" o "moduladores alostéricos positivos", mientras que aquellos que reducen la actividad de la proteína se denominan en la presente "inhibidores alostéricos" o, de otro modo, "moduladores alostéricos negativos".

[0068] Preferiblemente, el dominio de unión a proteínas descrito en la presente es capaz de unirse específicamente a un GPCR unido a un agonista y/o mejora la afinidad de un GPCR por un agonista. Se prefiere que el dominio de unión a proteínas sea capaz de aumentar la afinidad por el agonista al menos dos veces, al menos cinco veces y, más preferiblemente, al menos diez veces tras la unión al receptor medida por una reducción en EC_{50} , IC_{50} , K_d o cualquier otra medida de afinidad o potencia conocida por alguien experto en la materia.

[0069] Se apreciará que tener una estabilidad aumentada con respecto a la estructura y/o una actividad biológica particular de un GPCR también puede ser una guía a la estabilidad de otros desnaturizantes o condiciones de desnaturización incluidos el calor, un detergente, un agente caotrópico y un pH extremo. Por consiguiente, el dominio de unión a proteínas descrito en la presente puede ser además capaz de aumentar la estabilidad de un estado conformacional funcional de un GPCR bajo condiciones no fisiológicas inducidas por dilución, concentración, composición de tampón, calentamiento, enfriamiento, congelación, detergente, agente caotrópico, pH. A diferencia de las proteínas hidrosolubles, los estudios termodinámicos del plegamiento y estabilidad de las proteínas de membrana han demostrado ser extremadamente desafiantes y complicados por la dificultad de encontrar las condiciones para el plegamiento reversible. El despliegue de proteínas de membrana helicoidales inducido por la mayoría de los métodos, tales como los enfoques térmicos y químicos, es irreversible, como revisan Stanley y Fleming (2008). Por lo tanto, el término "termoestabilizar", "termoestabilización", "aumentando la termoestabilidad de", como se utiliza en la presente, se refiere a las propiedades funcionales antes que a las termodinámicas de un GPCR y a la resistencia de la proteína a la desnaturización irreversible inducida por los enfoques térmicos y/o

químicos incluidos, pero de forma no limitativa, calentamiento, enfriamiento, congelación, desnaturalizantes químicos, pH, detergentes, sales, aditivos, proteasas o temperatura. La desnaturalización irreversible conduce al despliegue irreversible de las conformaciones funcionales de la proteína, la pérdida de actividad biológica y la agregación de la proteína desnaturalizada. El término "(termo)estabilizar", "(termo)estabilización", "aumentar la (termo)estabilidad de", como se utiliza en la presente, se aplica a los GPCR incluidos en partículas lipídicas o capas lipídicas (por ejemplo, monocapas lipídicas, bicapas lipídicas y similares) y a los GPCR que se han solubilizado en detergente.

[0070] Preferiblemente, el dominio de unión a proteínas descrito en la presente es capaz de aumentar la termoestabilidad de un estado conformacional funcional de un GPCR, preferiblemente, un estado conformacional activo de un GPCR. En relación con una estabilidad aumentada al calor, esta se puede determinar fácilmente midiendo la unión de ligando o usando métodos espectroscópicos tales como fluorescencia, CD o dispersión de luz, que son sensibles al despliegue a temperaturas en aumento (véase también la sección de Ejemplos). Se prefiere que el dominio de unión a proteínas sea capaz de aumentar la estabilidad medida por un aumento en la estabilidad térmica de un GPCR en un estado conformacional funcional con al menos 2°C, al menos 5°C, al menos 8°C y, más preferiblemente, al menos 10°C o 15°C o 20°C. También preferiblemente, el dominio de unión a proteínas puede ser capaz de aumentar la estabilidad térmica de una conformación funcional de un GPCR en complejo con un ligando tal como, pero no restringido a, un agonista, un agonista inverso, un antagonista y/o un modulador o un inhibidor del GPCR o la vía de señalización dependiente de GPCR. También preferiblemente, el dominio de unión a proteínas puede ser capaz de aumentar la estabilidad en presencia de un detergente o un caotrópico de un estado conformacional funcional de un GPCR. Preferiblemente, el dominio de unión a proteínas es capaz de aumentar la estabilidad a la desnaturalización inducida por enfoques térmicos o químicos del estado conformacional activo de un GPCR. En relación con una estabilidad aumentada al calor, un detergente o a un caotrópico, típicamente, el GPCR se incuba durante un tiempo definido en presencia de un detergente de prueba o un agente caotrópico de prueba y la estabilidad se determina usando, por ejemplo, la unión de ligando o un método espectroscópico, opcionalmente a temperaturas en aumento, como se ha mencionado anteriormente. Todavía preferiblemente, el dominio de unión a proteínas puede ser capaz de aumentar la estabilidad a un pH extremo de un estado conformacional funcional de un GPCR. Preferiblemente, el dominio de unión a proteínas es capaz de aumentar la estabilidad a un pH extremo del estado conformacional activo de un GPCR. En relación con un extremo del pH, un pH de prueba típico se elegiría, por ejemplo, en el rango de 6 a 8, el rango de 5,5 a 8,5, el rango de 5 a 9, el rango de 4,5 a 9,5, más específicamente en el rango de 4,5 a 5,5 (pH bajo) o en el rango de 8,5 a 9,5 (pH alto).

[0071] Los dominios de unión a proteínas descritos en la presente pueden generalmente dirigirse contra cualquier GPCR deseado y, en particular, pueden dirigirse contra cualquier epítipo conformacional de cualquier GPCR, preferiblemente un estado conformacional funcional de cualquier GPCR, más preferiblemente un estado conformacional activo de un GPCR (todos tal y como se ha definido anteriormente). Más particularmente, dicho epítipo conformacional puede ser parte de una región intracelular o extracelular, o una región intramembranosa, o un dominio o estructura de bucle de cualquier GPCR deseado. Los dominios de unión a proteínas se pueden dirigir contra cualquier región extracelular, dominio, bucle u otro epítipo conformacional extracelular adecuados de un GPCR, pero se dirige preferiblemente contra una de las partes extracelulares de los dominios transmembranarios o, más preferiblemente, contra uno de los bucles extracelulares que unen los dominios transmembranarios. Alternativamente, los dominios de unión a proteínas se pueden dirigir contra cualquier región intracelular, dominio, bucle u otro epítipo conformacional intracelular adecuados de un GPCR, pero se dirige preferiblemente contra una de las partes intracelulares de los dominios transmembranarios o, más preferiblemente, contra uno de los bucles intracelulares que unen los dominios transmembranarios. Un dominio de unión a proteínas que se une específicamente a un epítipo "tridimensional" o epítipo "conformacional" se une específicamente a una estructura terciaria (es decir, tridimensional) de una proteína plegada y se une con mucha menor afinidad (es decir, por un factor de al menos 2, 5, 10, 50 o 100) a la forma lineal (es decir, desplegada, desnaturalizada) de la proteína. Se espera además que los dominios de unión a proteínas descritos en la presente se unirán generalmente a todos los análogos de origen natural o sintéticos, variantes, mutantes, alelos de dicho GPCR.

[0072] En un ejemplo específico, el dominio de unión a proteínas descrito en la presente es capaz de unirse específicamente a un epítipo conformacional intracelular de un GPCR. Preferiblemente, el dominio de unión a proteínas es capaz de unirse específicamente a un epítipo conformacional que está comprendido en, localizado en o se superpone con el sitio de unión a proteínas G de un GPCR. Más preferiblemente, dichos dominios de unión a proteínas pueden ocupar el sitio de unión a proteínas G de un estado conformacional funcional de un GPCR, más preferiblemente de un estado conformacional activo de un GPCR. De la manera más preferible, dichos dominios de unión a proteínas muestran un comportamiento similar a proteínas G. El término "comportamiento similar a proteínas G" como se utiliza en la presente se refiere a la propiedad de los dominios de unión a proteínas de unirse preferentemente a un receptor unido a un agonista frente a, por ejemplo, un receptor unido a un agonista inverso. Los dominios de unión a proteínas que muestran un comportamiento similar a proteínas G también mejoran la afinidad del receptor por los agonistas, que se atribuye a la interacción cooperativa entre el receptor ocupado por un agonista y la proteína G (véase también la sección de Ejemplos).

[0073] Preferiblemente, el dominio de unión a proteínas deriva de un sistema inmunitario innato o adaptativo. Preferiblemente, dicho dominio de unión a proteínas deriva de una inmunoglobulina. Preferiblemente, el dominio de unión a proteínas es un anticuerpo o un derivado del mismo. El término "anticuerpo" (Ab) se refiere generalmente a un polipéptido codificado por un gen de inmunoglobulina, o fragmentos funcionales del mismo, que se une específicamente y reconoce un antígeno, y es conocido por la persona experta en la materia. Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) convencional comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, donde cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente. El término "anticuerpo" pretende incluir anticuerpos enteros, incluidos anticuerpos enteros monocatenarios y fragmentos de unión al antígeno. En algunas formas de realización, los fragmentos de unión al antígeno pueden ser fragmentos de anticuerpo de unión al antígeno que incluyen, pero de forma no limitativa, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv enlazados por disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden o consisten en un dominio o VL o VH y cualquier combinación de esos o cualquier otra porción funcional de un péptido de inmunoglobulina capaz de unirse al antígeno diana. El término "anticuerpos" también pretende incluir anticuerpos de cadena pesada, o fragmentos funcionales de los mismos, tales como anticuerpos de dominio único, más específicamente, nanocuerpos, tal y como se define más adelante en la presente.

[0074] Preferiblemente, dicho dominio de unión a proteínas comprende una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones marco y 3 regiones determinantes de la complementariedad, preferiblemente en una secuencia FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, o cualquier fragmento adecuado de la misma (que contendrá entonces normalmente al menos algunos de los residuos de aminoácidos que forman al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad). Los dominios de unión a proteínas que comprenden 4 FR y 3 CDR son conocidos por la persona experta en la materia y han sido descritos, como un ejemplo no limitativo, en Wesolowski et al. (2009).

[0075] Preferiblemente, el dominio de unión a proteínas descrito en la presente deriva de un anticuerpo de camélido. Más preferiblemente, el dominio de unión a proteínas comprende una secuencia de aminoácidos de un nanocuerpo o cualquier fragmento adecuado del mismo. Más específicamente, el dominio de unión a proteínas de la invención es un nanocuerpo o cualquier fragmento adecuado del mismo. Un "nanocuerpo" (Nb), como se utiliza en la presente, se refiere al fragmento de unión a antígeno o dominio variable único ("VHH") más pequeño derivado de un anticuerpo de cadena pesada de origen natural y es conocido por la persona experta en la materia. Derivan de anticuerpos de solo cadena pesada, vistos en camélidos (Hamers-Casterman et al. 1993; Desmyter et al. 1996). En la familia de los "camélidos" se encuentran inmunoglobulinas desprovistas de cadenas polipeptídicas ligeras. Los "camélidos" comprenden camélidos del viejo mundo (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromedarius*) y camélidos del nuevo mundo (por ejemplo, *Lama paccos*, *Lama glama*, *Lama guanicoe* y *Lama vicugna*). Dicho anticuerpo de dominio variable único de cadena pesada se designa en la presente como un nanocuerpo o un anticuerpo VHH. Nanobody™, Nanobodies™ y Nanoclone™ son las marcas registradas de Ablynx NV (Bélgica). El tamaño pequeño y las propiedades biofísicas únicas de los Nb superan a los fragmentos de anticuerpo convencionales para el reconocimiento de epítomos raros u ocultos y para la unión en cavidades o sitios activos de dianas proteicas. Además, los Nb se pueden diseñar como anticuerpos biespecíficos y bivalentes o unirse a moléculas indicadoras (Conrath et al. 2001). Los Nb son proteínas de dominio único estables y rígidas que pueden fácilmente fabricarse y sobrevivir en el sistema gastrointestinal. Por lo tanto, los Nb se pueden usar en muchas aplicaciones, incluidas el descubrimiento de fármacos y el tratamiento farmacológico (Saerens et al. 2008), pero también como una herramienta versátil y valiosa para la purificación, el estudio funcional y la cristalización de proteínas (Conrath et al. 2009).

[0076] Los nanocuerpos según la invención comprenden generalmente una cadena de aminoácidos única que se puede considerar que comprende 4 "secuencias marco" o FR y 3 "regiones determinantes de la complementariedad" o CDR (como se ha definido anteriormente). Ejemplos no limitativos de nanocuerpos de la invención se describen con más detalle más adelante en la presente. Debe quedar claro que las regiones marco de los nanocuerpos también pueden contribuir a la unión de sus antígenos (Desmyter et al. 2002; Korotkov et al. 2009).

[0077] Ejemplos no limitativos de los nanocuerpos descritos en la presente incluyen, pero de forma no limitativa, nanocuerpos tal y como definen las SEQ ID NOs: 1-29 (véase la Fig. 12, tabla 1). La delineación de las secuencias CDR se basa en el sistema de numeración única IMGT para los dominios V y los dominios de tipo V (Lefranc et al. 2003). En una forma de realización específica, los nanocuerpos anteriores pueden comprender al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NOs: 30-70 (véase la figura 12; tabla 2). Más específicamente, los nanocuerpos anteriores se pueden seleccionar del grupo que comprende las SEQ ID NOs: 1-29, o un fragmento funcional de las mismas. Un "fragmento funcional" o un "fragmento adecuado", como se utiliza en la presente, puede comprender por ejemplo

uno de los bucles CDR. Preferiblemente, dicho fragmento funcional comprende la CDR3. Más específicamente, dichos nanocuerpos consisten en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-29 y dicho fragmento funcional de dichos nanocuerpos consisten en cualquiera de las SEQ ID NOs: 30-70. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifique cualquiera de los nanocuerpos o fragmentos funcionales anteriores también se prevé en la presente. Además, se prevén en la presente vectores de expresión que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de los nanocuerpos anteriores o fragmentos funcionales de los mismos, así como células huésped que expresan tales vectores de expresión. Los sistemas de expresión adecuados incluyen sistemas de expresión constitutivos e inducibles en bacterias o levaduras, sistemas de expresión víricos, tales como baculovirus, virus del bosque Semliki y lentivirus, o la transfección transitoria en células de insecto o de mamíferos. Las células huésped adecuadas incluyen *E. coli*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* y similares. Las células huésped animales adecuadas incluyen HEK 293, COS, S2, CHO, NSO, DT40 y similares. La clonación, expresión y/o purificación de los nanocuerpos se pueden hacer según técnicas conocidas por la persona experta en la técnica.

[0078] Debe tenerse en cuenta que el término nanocuerpo como se utiliza en la presente en su más amplio sentido no está limitado a una fuente biológica específica o a un método específico de preparación. Por ejemplo, los nanocuerpos de la invención pueden obtenerse generalmente: (1) por aislamiento del dominio VHH de un anticuerpo de cadena pesada de origen natural; (2) por expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio VHH de origen natural; (3) por "humanización" de un dominio VHH de origen natural o por expresión de un ácido nucleico que codifica un tal dominio VHH humanizado; (4) por "camelización" de un dominio VH de origen natural de cualquier especie animal y, en particular, de una especie de mamíferos, tal como de un ser humano, o por expresión de un ácido nucleico que codifica tal dominio VH camelizado; (5) por "camelización" de un "anticuerpo de dominio" o "Dab" como se describe en la técnica, o por expresión de un ácido nucleico que codifica tal dominio VH camelizado; (6) por uso de técnicas sintéticas o semisintéticas para preparar proteínas, polipéptidos u otras secuencias de aminoácidos conocidas *per se*; (7) por preparación de un ácido nucleico que codifica un nanocuerpo usando técnicas para la síntesis de ácidos nucleicos conocidas *per se*, seguido de la expresión del ácido nucleico así obtenido; y/o (8) por cualquier combinación de uno o más de lo anteriormente mencionado.

[0079] Una clase preferida de nanocuerpos corresponde a los dominios VHH de anticuerpos de cadena pesada de origen natural dirigidos contra un estado conformacional funcional de un GPCR. Aunque las bibliotecas naïf o sintéticas de nanocuerpos (para ejemplos de tales bibliotecas, véanse las WO9937681, WO0043507, WO0190190, WO03025020 y WO03035694) pueden contener ligantes conformacionales contra un GPCR en un estado conformacional funcional, un ejemplo preferido incluye la inmunización de un *Camelidae* con un GPCR en un estado conformacional funcional, unido opcionalmente a un ligando del receptor, para exponer el sistema inmunitario del animal con los epítopos conformacionales que son únicos del GPCR (por ejemplo, un GPCR unido a un agonista para generar anticuerpos dirigidos contra un GPCR en su estado conformacional activo). Así, como se describe más adelante en la presente, tales secuencias VHH pueden preferiblemente generarse u obtenerse inmunizando adecuadamente una especie de camélido con un GPCR, preferiblemente un GPCR en un estado conformacional funcional, más preferiblemente un estado conformacional activo (es decir, para generar una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra dicho GPCR), obteniendo una muestra biológica adecuada de dicho camélido (tal como una muestra de sangre o cualquier muestra de células B) y generando secuencias VHH dirigidas contra dicho GPCR, partiendo de dicha muestra. Tales técnicas estarán claras para la persona experta. Otra técnica más para obtener las secuencias VHH deseadas implica inmunizar adecuadamente un mamífero transgénico que sea capaz de expresar anticuerpos de cadena pesada (es decir, para generar una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra un GPCR en un estado conformacional funcional), obteniendo una muestra biológica adecuada de dicho mamífero transgénico (tal como una muestra de sangre o cualquier muestra de células B) y generando luego secuencias VHH dirigidas contra dicho GPCR partiendo de dicha muestra, usando cualquier técnica adecuada conocida *per se*. Por ejemplo, para este fin, se pueden usar los ratones que expresan anticuerpos de cadena pesada y los métodos y las técnicas adicionales descritas en la WO02085945 y en la WO04049794.

[0080] Por consiguiente, la divulgación abarca métodos de generación de dominios de unión a proteínas descritos en la presente. Como un ejemplo no limitativo, se proporciona un método de generación de nanocuerpos que se unen específicamente a un epítipo conformacional de un estado conformacional funcional de un GPCR, que comprende

- (i) la inmunización de un animal con un GPCR y
- (ii) el cribado de nanocuerpos que se unen específicamente a un epítipo conformacional de un estado conformacional funcional de dicho GPCR.

[0081] Preferiblemente, la inmunización de un animal se hará con un GPCR en presencia de un ligando del receptor, donde dicho ligando induce un estado conformacional funcional particular de dicho GPCR. Por ejemplo, se pueden generar nanocuerpos que se unan específicamente a un epítipo conformacional de un estado conformacional

activo de un GPCR por inmunización de un animal con un GPCR en presencia de un agonista que induce la formación de un estado conformacional activo de dicho GPCR (véase también la sección de Ejemplos).

[0082] Para la inmunización de un animal con un GPCR, el GPCR se puede producir y purificar usando métodos convencionales que pueden emplear la expresión de una forma recombinante del GPCR en una célula huésped y purificando el GPCR usando la cromatografía de afinidad y/o métodos a base de anticuerpos. Por ejemplo, el sistema baculovirus/Sf-9 se puede emplear para la expresión, aunque también se pueden usar otros sistemas de expresión (por ejemplo, sistemas celulares bacterianos, de levadura o de mamíferos). Métodos ejemplares para expresar y purificar GPCR se describen en, por ejemplo, Kobilka (1995), Eroglu et al (2002), Chelikani et al (2006) y el libro "Identification and Expression of G Protein-Coupled Receptors" (Kevin R. Lynch (Ed.), 1998), entre muchos otros. Un GPCR también se puede reconstituir en vesículas fosfolipídicas. Asimismo, se conocen métodos para reconstituir un GPCR activo en vesículas fosfolipídicas y se describen en: Luca et al (2003), Mansoor et al (2006), Niu et al. (2005), Shimada et al. (2002) y Eroglu et al. (2003), entre otros. En ciertos casos, el GPCR y los fosfolípidos se pueden reconstituir a alta densidad (por ejemplo, 1 mg de receptor por mg de fosfolípido). Las vesículas fosfolipídicas se pueden evaluar para confirmar que el GPCR está activo. En muchos casos, un GPCR puede estar presente en la vesícula fosfolipídica en ambas orientaciones (en la orientación normal y en la orientación "boca abajo" en la que los bucles intracelulares están en el exterior de la vesícula). Otros métodos de inmunización con un GPCR incluyen, sin limitación, el uso de células completas que expresan un GPCR, la vacunación con una secuencia de ácido nucleico que codifica un GPCR (por ejemplo, vacunación con ADN), la inmunización con virus o partículas similares a virus que expresan un GPCR, entre otros.

[0083] Cualquier animal adecuado, por ejemplo, un animal de sangre caliente, en particular un mamífero tal como un conejo, un ratón, una rata, un camello, una oveja, una vaca, un tiburón o un cerdo o un ave tal como un pollo o un pavo, se puede inmunizar usando cualquiera de las técnicas bien conocidas en la técnica adecuadas para generar una respuesta inmunitaria.

[0084] El cribado de nanocuerpos, como un ejemplo no limitativo, que se unen específicamente a un epítipo conformacional de un estado conformacional funcional de dicho GPCR puede realizarse, por ejemplo, por cribado de un conjunto, colección o biblioteca de células que expresan anticuerpos de cadena pesada en su superficie (por ejemplo, células B obtenidas de un camélido adecuadamente inmunizado) o bacteriófagos que muestran una fusión de genIII y nanocuerpo en su superficie, por cribado de una biblioteca (naïf o inmune) de secuencias VHH o secuencias de nanocuerpos o por cribado de una biblioteca (naïf o inmune) de secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias VHH o secuencias de nanocuerpos, que pueden todos realizarse de una manera conocida *per se*, y cuyo método puede opcionalmente comprender además uno o más pasos distintos adecuados, tales como, por ejemplo y sin limitación, un paso de maduración de afinidad, un paso de expresión de la secuencia de aminoácidos deseada, un paso de cribado de unión y/o de actividad contra el antígeno deseado (en este caso, el GPCR), un paso de determinación de la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos deseada, un paso de introducción de una o más sustituciones humanizantes, un paso de formateo en un formato multivalente y/o multiespecífico adecuado, un paso de cribado de las propiedades biológicas y/o fisiológicas deseadas (es decir, usando un ensayo adecuado conocido en la técnica) y/o cualquier combinación de uno o más de tales pasos, en cualquier orden adecuado.

[0085] Una clase particularmente preferida de nanocuerpos de la invención comprende nanocuerpos con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio VHH de origen natural, pero que se ha "humanizado", es decir, por sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia VHH de origen natural (y en particular en las secuencias marco) por uno o más de los residuos de aminoácidos que ocurren en la(s) posición(es) correspondiente(s) en un dominio VH a partir de un anticuerpo de 4 cadenas convencional de un ser humano. Esto se puede realizar de una manera conocida *per se*, que estará clara para la persona experta, en función de la descripción adicional en la presente y el estado de la técnica sobre humanización. De nuevo, debe tenerse en cuenta que tales nanocuerpos humanizados de la invención se pueden obtener de cualquier manera adecuada conocida *per se* (es decir, como se indica bajo los puntos (1)-(8) anteriores) y, por tanto, no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio VHH de origen natural como material de partida. Los nanocuerpos humanizados pueden tener varias ventajas, tales como una inmunogenicidad reducida, en comparación con los dominios VHH de origen natural correspondientes. Tal humanización implica generalmente la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de un VHH de origen natural con los residuos de aminoácidos que ocurren en la misma posición en un dominio VH humano, tal como un dominio VH3 humano. Las sustituciones humanizantes deberían elegirse de manera que los nanocuerpos humanizados resultantes retengan todavía las propiedades favorables de los nanocuerpos tal y como se define en la presente. La persona experta será capaz de seleccionar sustituciones humanizantes o combinaciones adecuadas de sustituciones humanizantes que optimizan o consiguen un equilibrio deseado o adecuado entre las propiedades favorables proporcionadas por las sustituciones humanizantes por un lado y las propiedades favorables de los dominios VHH de origen natural por otro lado.

[0086] Otra clase particularmente preferida de nanocuerpos de la invención comprende nanocuerpos con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de origen natural, pero que se ha "camelizado", es decir, por sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de origen natural a partir de un anticuerpo de 4 cadenas convencional por uno o más de los residuos de aminoácidos que ocurren en la(s) posición(es) correspondiente(s) en un dominio VHH de un anticuerpo de cadena pesada. Tales sustituciones de camelización se insertan preferiblemente en posiciones de aminoácidos que forman y/o están presentes en la interfase VH-VL y/o en los denominados residuos de marca distintiva de los *Camelidae*, tal y como se define en la presente (véase, por ejemplo, la WO9404678). Preferiblemente, la secuencia VH que se usa como material de partida o punto de partida para generar o diseñar el nanocuerpo camelizado es preferiblemente una secuencia VH de un mamífero, más preferiblemente la secuencia VH de un ser humano, tal como una secuencia VH3. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que tales nanocuerpos camelizados de la invención se pueden obtener de cualquier manera adecuada conocida *per se* (es decir, como se indica bajo los puntos (1)-(8) anteriores) y, por tanto, no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio VH de origen natural como material de partida.

[0087] Por ejemplo, tanto la "humanización" como la "camelización" se pueden realizar proporcionando una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio VHH o un dominio VH de origen natural, respectivamente, y luego cambiando, de una manera conocida *per se*, uno o más codones en dicha secuencia de nucleótidos de manera que la nueva secuencia de nucleótidos codifica un nanocuerpo "humanizado" o "camelizado" de la invención, respectivamente. Este ácido nucleico puede luego expresarse de una manera conocida *per se*, para proporcionar el nanocuerpo deseado de la invención. Alternativamente, basándose en la secuencia de aminoácidos de un dominio VHH o un dominio VH de origen natural, respectivamente, se puede diseñar y luego sintetizar *de novo* la secuencia de aminoácidos del nanocuerpo humanizado o camelizado deseado de la invención, respectivamente, usando técnicas para la síntesis de péptidos conocidas *per se*. Además, basándose en la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos de un dominio VHH o un dominio VH de origen natural, respectivamente, se puede diseñar y luego sintetizar *de novo* una secuencia de nucleótidos que codifica el nanocuerpo humanizado o camelizado deseado de la invención, respectivamente, usando técnicas para la síntesis de ácidos nucleicos conocidas *per se*, después de lo cual el ácido nucleico así obtenido se puede expresar de una manera conocida *per se*, para proporcionar el nanocuerpo deseado de la invención. Otros métodos y técnicas adecuados para obtener los nanocuerpos de la invención y/o los ácidos nucleicos que codifican los mismos, partiendo de secuencias VH de origen natural o preferiblemente de secuencias VHH, estarán claros para la persona experta y pueden, por ejemplo, comprender la combinación de una o más partes de una o más secuencias VH de origen natural (tales como una o más secuencias FR y/o secuencias CDR), una o más partes de una o más secuencias VHH de origen natural (tal como una o más secuencias FR o secuencias CDR) y/o una o más secuencias sintéticas o semisintéticas, de una manera adecuada, para proporcionar un nanocuerpo de la invención o una secuencia de nucleótidos o un ácido nucleico que codifica el mismo.

[0088] También está dentro del alcance de la invención el uso de análogos naturales o sintéticos, mutantes, variantes, alelos, homólogos y ortólogos (denominados colectivamente en la presente "análogos") de los nanocuerpos según la invención. Así, según una forma de realización de la invención, el término "nanocuerpo de la invención" en su más amplio sentido cubre también tales análogos. Generalmente, en tales análogos, uno o más residuos de aminoácidos, pueden haberse sustituido, eliminado y/o añadido, en comparación con los nanocuerpos de la invención tal y como se define en la presente. Tales sustituciones, inserciones, delecciones o adiciones pueden hacerse en una o más de las regiones marco y/o en una o más de las CDR. Los análogos, como se utiliza en la presente, son secuencias donde cada o cualquier región marco y cada o cualquier región determinante de la complementariedad muestra al menos un 80% de identidad, preferiblemente al menos un 85% de identidad, más preferiblemente un 90% de identidad, aún más preferiblemente un 95% de identidad con la región correspondiente en la secuencia de referencia (es decir, análogo_FR1 frente a referencia_FR1, análogo_CDR1 frente a referencia_CDR1, análogo_FR2 frente a referencia_FR2, análogo_CDR2 frente a referencia_CDR2, análogo_FR3 frente a referencia_FR3, análogo_CDR3 frente a referencia_CDR3, análogo_FR4 frente a referencia_FR4), medida en un alineamiento BLASTp (Altschul et al; 1987; definiciones de FR y CDR conforme al sistema de numeración única IMGT para los dominios V y los dominios de tipo V (Lefranc et al. 2003)).

[0089] Por medio de ejemplos no limitativos, una sustitución puede, por ejemplo, ser una sustitución conservadora (como se describe en la presente) y/o un residuo de aminoácido se puede sustituir por otro residuo de aminoácido que ocurre naturalmente en la misma posición en otro dominio VHH. Así, se incluyen dentro del alcance de la invención cualquier una o más sustituciones, delecciones o inserciones, o cualquier combinación de las mismas, que o mejoran las propiedades del nanocuerpo de la invención o que al menos no se desvían demasiado de las propiedades deseadas o del equilibrio o la combinación de propiedades deseadas del nanocuerpo de la invención (es decir, en la medida en que el nanocuerpo ya no es adecuado para su uso pretendido). Una persona experta será generalmente capaz de determinar y seleccionar sustituciones, delecciones, inserciones, adiciones adecuadas o combinaciones adecuadas de las mismas, basándose en la divulgación en la presente y opcionalmente después de un grado limitado de experimentación rutinaria, que puede, por ejemplo, implicar la introducción de un número limitado de sustituciones posibles y determinar su influencia sobre las propiedades de los nanocuerpos así obtenidos.

[0090] Por ejemplo, y en función del organismo huésped usado para expresar el dominio de unión a proteínas descrito en la presente, preferiblemente el nanocuerpo, tales delecciones y/o sustituciones se pueden diseñar de manera que se eliminan uno o más sitios para la modificación postraducciona (tal como uno o más sitios de glicosilación), como estará en la capacidad de la persona experta en la materia. Alternativamente, se pueden diseñar sustituciones o inserciones para introducir uno o más sitios para la unión de grupos funcionales (como se describe en la presente), por ejemplo, para permitir la PEGilación específica de sitio.

[0091] Ejemplos de modificaciones, así como ejemplos de residuos de aminoácidos en la secuencia del dominio de unión a proteínas, preferiblemente la secuencia del nanocuerpo, que se pueden modificar (es decir, o en el esqueleto de la proteína, pero preferiblemente en una cadena lateral), métodos y técnicas que se pueden usar para introducir tales modificaciones y los usos y las ventajas potenciales de tales modificaciones estarán claras para la persona experta. Por ejemplo, tal modificación puede implicar la introducción (por ejemplo, por unión covalente o de otra manera adecuada) de uno o más grupos funcionales, residuos o fracciones en o sobre el nanocuerpo de la invención y, en particular, de uno o más grupos funcionales, residuos o fracciones que confieran una o más propiedades o funcionalidades deseadas al nanocuerpo de la invención. Ejemplos de tales grupos funcionales y de técnicas para introducirlos estarán claras para la persona experta y pueden comprender generalmente todos los grupos funcionales y técnicas mencionados en el estado de la técnica general citado anteriormente, así como los grupos funcionales y técnicas conocidas *per se* para la modificación de proteínas farmacéuticas y, en particular, para la modificación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (incluidos ScFv y anticuerpos de dominio único), para los cuales se hace referencia por ejemplo a Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Tales grupos funcionales pueden, por ejemplo, unirse directamente (por ejemplo, de manera covalente) a un nanocuerpo de la invención, u opcionalmente a través de un conector o separador adecuado, como de nuevo estará claro para la persona experta. Una de las técnicas más ampliamente usada para aumentar la vida media y/o reducir la inmunogenicidad de las proteínas farmacéuticas comprende la unión de un polímero aceptable adecuado farmacológicamente, tal como el poli(etilenglicol) (PEG) o derivados del mismo (tal como el metoxipoli(etilenglicol) o mPEG). Generalmente, se puede usar cualquier forma adecuada de PEGilación, como la PEGilación usada en la técnica para anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (incluidos, pero de forma no limitativa, anticuerpos de dominio (único) y ScFv); se hace referencia a, por ejemplo, Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); por Veronese y Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), por Harris y Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003) y en la WO04060965. Varios reactivos para la PEGilación de proteínas están también disponibles comercialmente, por ejemplo, de Nektar Therapeutics, EE.UU. Preferiblemente, se usa una PEGilación dirigida al sitio, en particular a través de un residuo de cisteína (véase, por ejemplo, Yang et al., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003)). Por ejemplo, para este fin, se puede unir PEG a un residuo de cisteína que ocurre naturalmente en un nanocuerpo de la invención, se puede modificar un nanocuerpo de la invención para introducir adecuadamente uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG o se puede fusionar una secuencia de aminoácidos que comprende uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG al extremo N- y/o C-terminal de un nanocuerpo de la invención, todos usando técnicas de ingeniería de proteínas conocidas *per se* para la persona experta. Preferiblemente, para los nanocuerpos de la invención, se usa un PEG con un peso molecular de más de 5000, tal como más de 10.000 y menos de 200.000, tal como menos de 100.000; por ejemplo, en el rango de 20.000-80.000. Otra modificación, normalmente menos preferida, comprende la N-glicosilación o la O-glicosilación, normalmente como parte de una modificación cotraducciona y/o postraducciona, en función de la célula huésped usada para expresar el nanocuerpo de la invención. Otra técnica para aumentar la vida media de un nanocuerpo puede comprender el diseño de nanocuerpos bifuncionales (por ejemplo, un nanocuerpo contra el GPCR diana y uno contra una proteína sérica tal como la albúmina) o en fusiones de nanocuerpos con péptidos (por ejemplo, un péptido contra una proteína sérica tal como la albúmina).

[0092] Otra modificación puede comprender la introducción de uno o más marcadores detectables u otros grupos o fracciones generadores de señales, en función del uso pretendido del dominio de unión a proteínas marcado, en particular el nanocuerpo. Marcadores adecuados y técnicas para unirlos, usarlos y detectarlos estarán claros para la persona experta y, por ejemplo, incluyen, pero de forma no limitativa, marcadores fluorescentes (tales como fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído, y fluorescamina y metales fluorescentes tales como el Eu u otros metales de la serie de los lantánidos), marcadores fosforescentes, marcadores quimioluminiscentes o marcadores bioluminiscentes (tales como luminal, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sales de acridinio, éster oxalato, dioxetano o GFP y sus análogos), radioisótopos, metales, quelatos de metales o cationes metálicos u otros metales o cationes metálicos que son particularmente adecuados para usar en el diagnóstico y la obtención de imágenes *in vivo*, *in vitro* o *in situ*, así como cromóforos y enzimas (tales como malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-V-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, biotinavidina peroxidasa, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa-oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-VI-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolina esterasa). Otros marcadores adecuados estarán claros para la persona experta y, por ejemplo, incluyen fracciones que se pueden detectar usando RMN o espectroscopia ESR. Tales nanocuerpos de la invención marcados pueden, por ejemplo, usarse para ensayos *in vitro*, *in vivo* o *in situ* (incluidos inmunoensayos conocidos *per se* tales como ELISA, RIA, EIA y otros "ensayos de sándwich", etc.), así como con fines de diagnóstico y obtención de imágenes *in vivo*, en función de la elección del marcador específico. Como estará claro para la persona experta, otra modificación puede implicar la introducción

de un grupo quelante, por ejemplo, para quelar uno de los metales o cationes metálicos referidos anteriormente. Los grupos quelantes adecuados, por ejemplo, incluyen, sin limitación, el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Otra modificación más puede comprender la introducción de un grupo funcional que sea una parte de un par de unión específico, tal como el par de unión biotina-(estrept)avidina. Tal grupo funcional se puede usar para unir el nanocuerpo de la invención a otra proteína, polipéptido o compuesto químico que está unido a la otra mitad del par de unión, es decir, a través de la formación del par de unión. Por ejemplo, un nanocuerpo de la invención se puede conjugar con biotina y unir a otra proteína, polipéptido, compuesto o portador conjugado con avidina o estreptavidina. Por ejemplo, tal nanocuerpo conjugado se puede usar como un indicador, por ejemplo, en un sistema diagnóstico donde un agente productor de una señal detectable se conjuga con avidina o estreptavidina. Tales pares de unión pueden, por ejemplo, usarse también para unir el nanocuerpo de la invención a un portador, incluidos portadores adecuados para usos farmacéuticos. Un ejemplo no limitativo son las formulaciones liposómicas descritas por Cao y Suresh, *Journal of Drug Targeting*, 8, 4, 257 (2000). Tales pares de unión también se pueden usar para unir un agente terapéuticamente activo al nanocuerpo de la invención.

[0093] En una forma de realización particular, el nanocuerpo de la invención es bivalente y se forma por unión, químicamente o por técnicas de ADN recombinante, de dos dominios únicos monovalentes de cadenas pesadas. En otra forma de realización particular, el nanocuerpo de la invención es biespecífico y se forma por unión de dos dominios variables de cadenas pesadas, cada uno con una especificidad diferente. De forma similar, los polipéptidos que comprenden nanocuerpos multivalentes o multispecíficos incluyen aquí como ejemplos no limitativos. Preferiblemente, un nanocuerpo monovalente de la invención es tal que se unirá a una región, dominio, bucle, parte extracelular u otro epítipo extracelular de un estado conformacional funcional de un GPCR, más preferiblemente un estado conformacional activo de un GPCR, con una afinidad de menos de 500 nM, preferiblemente menos de 200 nM, más preferiblemente menos de 10 nM, tal como menos de 500 pM. Alternativamente, un nanocuerpo monovalente de la invención es tal que se unirá a una parte, región, dominio, bucle u otro epítipo intracelular de un estado conformacional funcional de un GPCR, más preferiblemente un estado conformacional activo de un GPCR con una afinidad de menos de 500 nM, preferiblemente menos de 200 nM, más preferiblemente menos de 10 nM, tal como menos de 500 pM. Además, según este aspecto, cualquier nanocuerpo multivalente o multispecífico (como se define en la presente) de la invención también puede dirigirse adecuadamente contra dos o más regiones, dominios, bucles, partes extracelulares o intracelulares diferentes u otros epítipos extracelulares o intracelulares en el mismo antígeno, por ejemplo contra dos bucles extracelulares o intracelulares diferentes o contra dos partes extracelulares o intracelulares diferentes de los dominios transmembrenarios. Tales nanocuerpos multivalentes o multispecíficos de la invención también pueden tener (o diseñarse y/o seleccionarse para) una avidéz aumentada y/o una selectividad mejorada por el GPCR deseado y/o para cualquier otra propiedad deseada o combinación de propiedades deseadas que se pueda obtener mediante el uso de tales nanocuerpos multivalentes o multispecíficos. En una forma de realización particular, tales nanocuerpos multivalentes o multispecíficos de la invención también pueden tener (o diseñarse y/o seleccionarse para) una eficacia mejorada en la modulación de la actividad de señalización de un GPCR (véase también más adelante en la presente). Se apreciará que los nanocuerpos multivalentes o multispecíficos según la invención pueden adicionalmente dirigirse adecuadamente a un antígeno diferente, tal como, pero sin limitarse a, un ligando que interactúa con un GPCR o una o más proteínas de señalización aguas abajo.

[0094] También se describe en la presente un complejo que comprende (i) un dominio de unión a proteínas como se describe en la presente, (ii) un GPCR en un estado conformacional funcional y, opcionalmente, (iii) un ligando del receptor. Un "ligando del receptor" o un "ligando", tal y como se define en la presente, puede ser un compuesto pequeño, una proteína, un péptido, un andamio de proteína, un ácido nucleico, un ion, un carbohidrato o un anticuerpo, o cualquier fragmento adecuado derivado del mismo, y similares. Preferentemente, el ligando es de la clase de los agonistas y el receptor está en un estado conformacional activo. El ligando también puede ser un agonista inverso, un antagonista o un ligando sesgado. Los ligandos pueden ser ortoestéricos o alostéricos. Los ligandos incluyen también moduladores alostéricos, potenciadores, intensificadores, moduladores alostéricos negativos e inhibidores. Pueden tener actividad biológica por sí mismos o pueden modular la actividad solo en presencia de otro ligando. Neubig et al (2003) describen muchas de las clases de ligandos.

[0095] Preferiblemente, se describe un complejo donde el dominio de unión a proteínas se une al GPCR; más preferiblemente, el dominio de unión a proteínas se une al GPCR, donde dicho GPCR se une a un ligando del receptor. Para ilustrar esto adicionalmente, y sin el fin de ser limitativo, un complejo ternario estable que contiene un nanocuerpo, un GPCR y un agonista se puede purificar por cromatografía de afinidad o filtración en gel a partir de una mezcla, que contiene (1) un nanocuerpo que es específico para la conformación activa de este GPCR, (2) el receptor solubilizado con detergente y (3) un agonista.

[0096] Preferiblemente, el complejo es cristalino. Así, también se proporciona un cristal del complejo, así como métodos para hacer dicho cristal, que se describen en mayor detalle a continuación. Preferiblemente, se prevé una forma cristalina de un complejo que comprende (i) un dominio de unión a proteínas como se describe en la presente, (ii) un GPCR en un estado conformacional funcional, más preferiblemente un estado conformacional activo, y,

opcionalmente, (iii) un ligando del receptor, donde dicha forma cristalina se obtiene mediante el uso de un dominio de unión a proteínas descrito en la presente.

[0097] El complejo también puede estar en una forma solubilizada, por ejemplo, después de una solubilización acuosa con un detergente. Alternativamente, el complejo puede inmovilizarse en un soporte sólido. Ejemplos no limitativos de soportes sólidos, así como métodos y técnicas para la inmovilización se describen más adelante en la descripción detallada. En otro ejemplo más, el complejo puede estar en una "composición celular", incluido un organismo, un tejido, una célula, una línea celular, y una composición de membrana derivada de dicho organismo, tejido, célula o línea celular. Dicha composición de membrana también pretende incluir cualquier composición liposómica que puede comprender lípidos naturales o sintéticos o una combinación de los mismos. Los ejemplos de composiciones de membrana o liposómicas incluyen, pero de forma no limitativa, orgánulos, preparaciones de membrana, lipopartículas similares a virus, capas lipídicas (bicapas y monocapas), vesículas lipídicas, lipopartículas de alta densidad (por ejemplo, nanodiscos) y similares. Se apreciará que una composición celular o una composición similar a una membrana o liposómica puede comprender lípidos naturales o sintéticos.

[0098] Por consiguiente, se describe además en la presente una composición celular, incluida una composición de membrana o liposómica derivada de la misma (todas tal y como se ha definido anteriormente) que comprende un dominio de unión a proteínas y/o un complejo como se describe en la presente. Preferiblemente, la composición celular que proporciona de y/o expresa el dominio de unión a proteínas es capaz de estabilizar y/o inducir un estado conformacional funcional de un GPCR tras la unión de dicho dominio de unión a proteínas. Se entenderá que resulta esencial retener una funcionalidad suficiente de las respectivas proteínas, para lo cual hay disponibles y son conocidos por el experto en la materia métodos y técnicas. También se apreciará que dicha composición celular puede proporcionar y/o expresar un GPCR diana endógena o exógenamente.

[0099] Preparaciones de los GPCR formados a partir de fragmentos de membrana o extractos de membrana-detergente se revisan en detalle en Cooper (2004), incorporada en la presente por referencia. Ejemplos no limitativos de preparaciones de receptor solubilizado se proporcionan más adelante en la sección de Ejemplos.

[0100] La transfección de células diana (por ejemplo, células de mamíferos) se puede llevar a cabo siguiendo principios perfilados por Sambrook y Russel (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3a edición, volumen 3, capítulo 16, sección 16.1-16.54). Además, la transducción viral también se puede realizar utilizando reactivos tales como vectores adenovirales. La selección del sistema vector viral, regiones reguladoras y célula huésped apropiados es conocimiento común en el nivel de habilidad ordinaria en la técnica. Las células transfectadas resultantes se mantienen en cultivo o congeladas para el uso posterior según prácticas estándar. Preferiblemente, las células son células eucarióticas, por ejemplo, células de levadura, o líneas celulares cultivadas, por ejemplo, líneas celulares de mamíferos, preferiblemente líneas celulares humanas, que expresan un GPCR de interés. Las líneas celulares preferidas que expresan funcionalmente el dominio de unión a proteínas y/o el GPCR incluyen células de insecto (por ejemplo, SF-9), líneas celulares humanas (por ejemplo, HEK293), líneas celulares de roedor (por ejemplo, CHO-K1), líneas celulares de camélido (Dubca).

[0101] Los dominios de unión a proteínas o los complejos o la composición celular descritos anteriormente se pueden usar en una variedad de contextos y aplicaciones, que se describirán en más detalle a continuación.

Cristalización y resolución de la estructura de un GPCR

[0102] La cristalización de proteínas de membrana, incluidos los GPCR, sigue siendo un desafío formidable. Aunque están apareciendo métodos de expresión y purificación que permiten la generación de cantidades de miligramos, conseguir estabilidad con estas moléculas es quizás el impedimento más difícil que hay que superar. La purificación necesita una liberación del GPCR de la bicapa lipídica por solubilización con detergente, un proceso durante el que las superficies hidrofóbicas de la proteína se recubren con monómeros surfactantes para formar un complejo proteína-detergente (PDC). Sin embargo, el cinturón de detergente formado alrededor de la proteína es una mala sustitución para la bicapa lipídica, ya que se pierde mucha de la presión lateral ejercida sobre la proteína por los lípidos circundantes. Así, la solubilización de proteínas de membrana a menudo resulta en desestabilización, despliegue y agregación posterior. Los GPCR distintos a la rodopsina tienen típicamente una mala estabilidad en detergentes y son propensos a la agregación y la proteólisis. Los esfuerzos para cristalizar los GPCR han sido frustrados por otras características intrínsecas de las proteínas de membrana integrales. Las siete hélices transmembranarias hidrofóbicas de los GPCR crean malas superficies para los contactos cristalinos, y los dominios extracelulares e intracelulares son a menudo relativamente cortos y/o están mal estructurados. Además, para la rodopsina (un GPCR atípico en cuanto a abundancia natural y estabilidad), los primeros cristales de los GPCR se obtuvieron de β_2 AR unidos a un fragmento Fab que reconoció un epítipo compuesto por los extremos amino y carboxilo terminales del tercer bucle intracelular que conecta los TM 5 y 6 (Rasmussen, 2007). En el segundo enfoque, el tercer bucle intracelular se sustituyó por lisozima T4 (β_2 AR-T4L; Rosenbaum, 2007). Finalmente, la destacable versatilidad de los GPCR como moléculas de señalización se puede atribuir a su estructura

tridimensional flexible y dinámica. Desafortunadamente, tal comportamiento dinámico es particularmente desafiante para un análisis estructural de alta resolución. El crecimiento de cristales de calidad de difracción requiere una proteína estable, conformacionalmente homogénea. Como tal, los cristales de calidad de difracción de un GPCR nativo no unido son difíciles de obtener e, incluso cuando se consigue este objetivo, la estructura cristalina representará solo una de las muchas conformaciones nativas. Muchos de estos problemas se pueden resolver en la invención mediante el uso de nanocuerpos como herramientas para estabilizar, purificar y cristalizar estados conformacionales activos de los GPCR para el análisis estructural de alta resolución.

[0103] Por lo tanto, uno de los objetivos es usar dominios de unión a proteínas como herramientas para estabilizar proteínas GPCR y además usar estos dominios de unión a proteínas como ayudas para la cocristalización para los GPCR o, en otras palabras, para facilitar la cristalogénesis de los GPCR, preferiblemente en un estado conformacional funcional.

[0104] Por consiguiente, también se describe en la presente el uso de un dominio de unión a proteínas como se describe en la presente, o un complejo que comprende el dominio de unión a proteínas o una composición celular que proporciona el dominio de unión a proteínas, para estabilizar un GPCR en un estado conformacional funcional, en particular en un estado conformacional activo; y/o para inducir la formación de un estado conformacional funcional particular (preferiblemente, activo) dentro de un GPCR. Se apreciará que tal dominio de unión a proteínas es una herramienta muy útil para purificar, para cristalizar y/o para resolver la estructura de un GPCR en un estado conformacional funcional, en particular en su estado conformacional activo. Como se ha descrito claramente antes, debe quedar claro que los dominios de unión a proteínas descritos en la presente que se van a usar para la purificación, la estabilización, la cristalización y/o la resolución de la estructura de un GPCR se pueden dirigir contra cualquier GPCR deseado y se pueden unir específicamente a o reconocer un epítipo conformacional de un estado conformacional funcional, preferiblemente un estado conformacional activo, de cualquier GPCR deseado. En particular, dicho epítipo conformacional puede ser parte de una región intracelular o extracelular, o una región intramembranosa, o un dominio o estructura de bucle de cualquier GPCR deseado.

[0105] Primero, los dominios de unión a proteínas descritos en la presente pueden aumentar la termoestabilidad de los receptores solubilizados con detergente, estabilizados en un estado conformacional particular, protegiéndolos de la degradación proteolítica y/o la agregación y facilitando la purificación y la concentración de muestras homogéneas de receptor correctamente plegado. Las personas expertas en la materia reconocerán que tales muestras son el punto de partida preferido para la generación de cristales difractantes.

[0106] La cristalización del receptor purificado es otro cuello de botella principal en el proceso de determinación de la estructura macromolecular por cristalografía de rayos X. La cristalización exitosa requiere la formación de núcleos y su crecimiento posterior hasta cristales de tamaño adecuado. El crecimiento de cristales ocurre generalmente de forma espontánea en una solución sobresaturada como resultado de una nucleación homogénea. Las proteínas se pueden cristalizar en un experimento de cribado de matriz dispersa típico, donde se prueban extensamente los precipitantes, los aditivos y la concentración de proteína, y se pueden identificar las condiciones de sobresaturación adecuadas para la nucleación y el crecimiento de cristales para una proteína particular. Relacionada con el enfoque de cribado de matriz dispersa está la generación de variación estructural en la proteína misma, por ejemplo por adición de ligandos que se unen a la proteína, o produciendo diferentes mutaciones, preferentemente en residuos superficiales de la proteína diana o probando a cristalizar ortólogos de diferentes especies de la proteína diana (Chang 1998). Un hallazgo inesperado de la presente invención es la utilidad de los nanocuerpos que se unen específicamente a un GPCR para introducir un grado de variación estructural tras la unión a la vez que conservan el plegamiento general del GPCR. Diferentes nanocuerpos generarán diferentes estructuras cuaternarias proporcionando nuevas interfases distintas para la formación de redes cristalinas dando como resultado múltiples formas cristalinas a la vez que conservan el plegamiento general del GPCR.

[0107] Debido a que la cristalización implica una pérdida desfavorable de entropía conformacional en la molécula que se va a ensamblar en la red cristalina, los métodos que reducen la entropía conformacional de la diana mientras están todavía en solución deberían mejorar la probabilidad de cristalización mediante la reducción de la penalización entrópica neta de la formación de redes. El enfoque de 'reducción de entropía superficial' ha demostrado ser altamente eficaz (Derewenda 2004). Asimismo, las parejas de unión tales como iones, ligandos de molécula pequeña y péptidos pueden reducir la heterogeneidad conformacional uniéndose a y estabilizando un subconjunto de estados conformacionales de una proteína. Aunque tales parejas de unión son eficaces, no todas las proteínas tienen una pareja de unión conocida, e incluso cuando se conoce una pareja de unión, su afinidad, solubilidad y estabilidad química pueden no ser compatibles con ensayos de cristalización. Por lo tanto, se descubrió sorprendentemente que los nanocuerpos de la presente invención se pueden usar como herramientas para aumentar la probabilidad de obtener cristales bien ordenados minimizando la heterogeneidad conformacional en el GPCR diana mediante la unión a una conformación particular del receptor.

[0108] La cristalización de los GPCR para estudios estructurales de alta resolución es particularmente difícil debido a la superficie anfipática de estas proteínas de membrana. Incluidos en la bicapa de membrana, los sitios de

contacto de la proteína con las cadenas acílicas de los fosfolípidos son hidrofóbicos, mientras que las superficies polares están expuestas a los grupos de cabeza polares de los lípidos y a las fases acuosas. Para obtener cristales tridimensionales bien ordenados -un prerequisite para el análisis estructural de rayos X con alta resolución- los GPCR se solubilizan con la ayuda de detergentes y se purifican como complejos proteína-detergente. La micela de detergente cubre la superficie hidrofóbica de la proteína de membrana de una manera similar a un cinturón (Hunte y Michel 2002; Ostermeier et al. 1995). Los complejos GPCR-detergente forman cristales tridimensionales donde se forman contactos entre moléculas de proteínas adyacentes por las superficies polares de la proteína que salen de la micela de detergente (Day et al. 2007). Obviamente, la micela de detergente requiere espacio en la red cristalina. Aunque las interacciones atractivas entre las micelas pueden estabilizar el empaquetamiento cristalino (Rasmussen et al. 2007; Dunn et al. 1997), estas interacciones no conducen a contactos cristalinos rígidos. Debido a que muchas proteínas de membrana, incluidos los GPCR, contienen dominios hidrofílicos relativamente pequeños o altamente flexibles, una estrategia para aumentar la probabilidad de conseguir cristales bien ordenados es agrandar la superficie polar de la proteína y/o a reducir su flexibilidad. Así, los nanocuerpos de la presente invención se pueden usar para agrandar las superficies polares de la proteína, complementando la cantidad de superficie de proteína que puede facilitar contactos primarios entre moléculas en la red cristalina. Los nanocuerpos de la presente invención pueden reducir también la flexibilidad de sus regiones extracelulares para hacer crecer cristales bien ordenados. Los nanocuerpos son especialmente adecuados para este fin porque están compuestos de un dominio globular rígido único y están desprovistos de regiones conectoras flexibles, a diferencia de los anticuerpos convencionales o los fragmentos derivados tales como los Fab.

[0109] El complejo que comprende el dominio de unión a proteínas como se describe en la presente y el GPCR diana en un estado conformacional funcional, preferiblemente un estado conformacional activo, se puede cristalizar usando cualquiera de una variedad de métodos de cristalización especializados para proteínas de membrana, muchos de los cuales se revisan en Caffrey (2003). En términos generales, los métodos son métodos basados en lípidos que incluyen la adición de lípido al complejo de GPCR-nanocuerpo antes de la cristalización. Tales métodos se han usado previamente para cristalizar otras proteínas de membrana. Muchos de estos métodos, incluido el método de cristalización de fase cúbica lipídica y el método de cristalización de bicelas, explotan las propiedades de autoensamblaje espontáneo de los lípidos y el detergente como vesículas (método de fusión de vesículas), micelas discoidales (método de bicelas) y cristales líquidos o mesofases (en el método de fase cúbica o meso). Se describen métodos de cristalización de fases cúbicas lipídicas en, por ejemplo: Landau et al. 1996; Gouaux 1998; Rummel et al. 1998; Nollert et al. 2004, cuyas publicaciones se incorporan por referencia para la divulgación de esos métodos. Se describen métodos de cristalización de bicelas en, por ejemplo: Faham et al. 2005; Faham et al. 2002, cuyas publicaciones se incorporan por referencia para la divulgación de esos métodos.

[0110] Se describe además en la presente el uso de un dominio de unión a proteínas como se ha descrito anteriormente para resolver una estructura de un GPCR. La estructura de una proteína, en particular un GPCR, incluye la estructura primaria, secundaria, terciaria y, si corresponde, cuaternaria de dicha proteína. La "resolución de la estructura" como se utiliza en la presente se refiere a la determinación de la disposición de los átomos o las coordenadas atómicas de una proteína y se hace a menudo por un método biofísico, tal como la cristalografía de rayos X.

[0111] En la cristalografía de rayos X, los datos de difracción cuando se ensamblan debidamente da la amplitud de la transformada de Fourier 3D de la densidad electrónica de la molécula en la célula unitaria. Si se conocen las fases, la densidad electrónica se puede obtener sencillamente por síntesis de Fourier. Para un complejo proteico, el éxito para derivar información de fase a partir de una sustitución molecular (MR) solo es discutible cuando la fracción de proteínas con una estructura conocida (los modelos de búsqueda) es baja (menos de un 50% del contenido de aminoácidos) y/o cuando los cristales exhiben una calidad de difracción limitada. Aunque la combinación de sustitución isomorfa múltiple (MIR) y la determinación de fases MR ha demostrado ser exitosa para los complejos proteicos (por ejemplo, Ostermeier et al. 1995; Li et al. 1997; Hunte et al. 2000), el requisito de producción de un buen derivado de átomo pesado es casi siempre problemático. A lo largo de la década pasada, los enfoques de MIR tradicionales han sido generalmente reemplazados por el uso de datos de dispersión anómalos usando principalmente la incorporación de selenometionina (SeMet) (MAD o SAD) (Hendrickson 1991). De hecho, los datos experimentales anómalos que usan energías Se-edge proporcionan generalmente una información de fase superior y menos sesgada en comparación con datos de determinación de fases tanto de MIR como de MR basada en modelos. Un ejemplo se refiere al uso de nanocuerpos para la determinación de fases de complejos GPCR-nanocuerpo por MR o MAD. Los nanocuerpos se expresan generalmente de manera robusta y son adecuados para la incorporación de SeMet. La determinación de fases de un complejo de GPCR-nanocuerpo introduciendo todos los sitios SeMet solo en el nanocuerpo elude la necesidad de incorporar sitios SeMet en el GPCR.

[0112] En muchos casos, la obtención de un cristal de calidad de difracción es la principal barrera para resolver su estructura de resolución atómica. Así, según formas de realización específicas, los nanocuerpos de la invención se pueden usar para mejorar la calidad de difracción de los cristales de modo que se pueda resolver la estructura cristalina de la proteína GPCR.

[0113] Hay gran interés en la información estructural para ayudar a guiar el descubrimiento de fármacos de GPCR. Para los GPCR cuyas estructuras se han resuelto ahora, se ha demostrado que estos esfuerzos de modelado son imprecisos al nivel requerido por los diseñadores de fármacos *in silico*. Con las estructuras de estado inactivo del β_2 AR, el β_1 AR y el receptor A2A, los químicos farmacéuticos ahora tienen datos experimentales para guiar el desarrollo de ligandos para varias dianas terapéuticas activas. Sin embargo, el valor de estas estructuras de alta resolución para el cribado *in silico* puede ser limitado. Estudios de acoplamiento molecular recientes usando la estructura cristalina de β_2 AR como un molde identificaron seis ligandos de β_2 AR nuevos que se unieron con afinidades que varían de 9 nM a 4 μ M; sin embargo, cada compuesto exhibió actividad de agonista inverso. Más allá de la cristalización de más GPCR, deben desarrollarse métodos para la adquisición de estructuras de receptores unidos a diferentes clases de ligandos incluidos agonistas, antagonistas, reguladores alostéricos y/o proteínas G. Por ejemplo, los cristales de receptores unidos a un agonista pueden proporcionar representaciones tridimensionales de los estados activos de los GPCR. Estas estructuras ayudarán a clarificar los cambios conformacionales que conectan los sitios de unión de ligando y de interacción con proteínas G, y conducen a hipótesis mecanísticas más precisas y finalmente a nuevos tratamientos. Dada la flexibilidad conformacional inherente a los GPCR activados por ligando y la heterogeneidad superior exhibida por los receptores unidos a un agonista, estabilizar tal estado no es fácil. Tales esfuerzos pueden beneficiarse de la estabilización de la conformación del receptor unido a un agonista mediante la adición de dominios de unión a proteínas que son específicos de un estado conformacional activo del receptor. Especialmente adecuados son los nanocuerpos que muestran un comportamiento similar a proteínas G y exhiben propiedades cooperativas con respecto a la unión de un agonista, tal y como se han previsto en la presente invención (véase la sección de Ejemplos).

[0114] De conformidad con esto, un método de determinación de una estructura cristalina de un GPCR en un estado conformacional funcional se describe en la presente, donde dicho método comprende los pasos de:

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

donde se determina la estructura cristalina de un GPCR en un estado conformacional funcional, preferiblemente el estado conformacional activo.

[0115] Dicha determinación de la estructura cristalina se puede realizar por un método biofísico tal como la cristalografía de rayos X. El método puede comprender además un paso de obtención de las coordenadas atómicas del cristal (como se ha definido anteriormente).

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

[0116] Otro ejemplo se refiere a un método para capturar y/o purificar un GPCR en un estado conformacional funcional, preferiblemente un estado conformacional activo, haciendo uso de cualquiera de los dominios de unión a proteínas descritos anteriormente, o complejos o composiciones celulares que comprenden tales dominios de unión a proteínas. La captura y/o la purificación de un GPCR, en un estado conformacional funcional, preferiblemente un estado conformacional activo, permitirá la cristalización posterior, la caracterización de ligandos y el cribado de compuestos, inmunizaciones, entre otros. En la práctica, tales métodos y técnicas incluyen, sin limitación, métodos basados en la afinidad tales como la cromatografía de afinidad, la purificación de afinidad, la inmunoprecipitación, la detección de proteínas, la inmunoquímica, la expresión en superficie, entre otros, y todos son bien conocidos por las personas expertas en la materia.

[0117] Así, un ejemplo particular se refiere al uso de un dominio de unión a proteínas descrito en la presente, o un complejo o una composición celular que comprende el mismo como se ha descrito en la presente antes, para capturar un GPCR en un estado conformacional funcional, preferiblemente para capturar un GPCR en su estado conformacional activo. Opcionalmente, pero no necesariamente, la captura de un GPCR en su estado conformacional funcional como se ha descrito anteriormente puede incluir capturar un GPCR en un estado conformacional funcional en complejo con un ligando del receptor o una o más proteínas de interacción aguas abajo.

[0118] De conformidad con esto, también se describe en la presente un método de captura de un GPCR en un estado conformacional funcional, donde dicho método comprende los pasos de:

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

donde se captura un GPCR en un estado conformacional funcional, preferiblemente un estado conformacional activo.

[0119] Más específicamente, también se prevé en la presente un método de captura de un GPCR en un estado conformacional funcional, donde dicho método comprende los pasos de:

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

10 donde un GPCR se captura en un estado conformacional funcional, preferiblemente un estado conformacional activo.

[0120] Se apreciará que cualquiera de los métodos descritos anteriormente puede comprender además el paso de purificar el complejo del dominio de unión a proteínas y el GPCR en su estado conformacional funcional.

Aplicaciones terapéuticas y diagnósticas

15 [0121] Tradicionalmente, se usan moléculas pequeñas para el desarrollo de fármacos dirigidos contra los GPCR, no solo porque las compañías farmacéuticas tienen razones históricas para trabajar con estas, sino de manera más importante debido a las limitaciones estructurales de los GPCR de la familia 1, que tienen el sitio de unión de ligando en la hendidura transmembranaria (Nat Rev Drug Discov. (2004) The state of GPCR research in 2004. Nature Reviews Drug Discovery GPCR Questionnaire Participants 3(7): 575, 577-626). Por esta razón resultó ser difícil o imposible generar anticuerpos monoclonales contra esta clase de dianas. Los dominios de unión a proteínas

20 descritos en la presente, en particular los nanocuerpos, pueden resolver este problema particular por medio de su propiedad intrínseca de unión a través de bucles de CDR extendidos en cavidades.

[0122] Por consiguiente, se describe además en la presente una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un dominio de unión a proteínas como se describe en la presente y al menos uno de entre un portador, adyuvante o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

25 [0123] Un 'portador, o 'adyuvante', en particular un 'portador farmacéuticamente aceptable' o 'adyuvante farmacéuticamente aceptable' es cualquier excipiente, diluyente, portador y/o adyuvante adecuado que, por sí mismos, no inducen la producción de anticuerpos nocivos para el individuo que recibe la composición ni provocan protección. Así, los portadores farmacéuticamente aceptables son intrínsecamente no tóxicos y no terapéuticos, y son conocidos por el experto en la materia. Los portadores o adyuvantes adecuados comprenden típicamente uno

30 o más de los compuestos incluidos en la siguiente lista no exhaustiva: macromoléculas grandes metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas víricas inactivas. Los portadores o adyuvantes pueden ser, como un ejemplo no limitativo, solución de Ringer, solución de dextrosa o solución de Hank. También pueden usarse soluciones no acuosas tales como aceites fijos y oleato de etilo. Un excipiente preferido es dextrosa al 5% en solución salina. El excipiente puede contener cantidades pequeñas de aditivos tales como sustancias que mejoran

35 la isotonicidad y la estabilidad química, incluidos tampones y conservantes.

[0124] La administración de un dominio de unión a proteínas como se describe en la presente o una composición farmacéutica del mismo puede ser por administración por vía oral, inhalada o parenteral. Por ejemplo, el dominio de unión a proteínas se puede administrar a través de una administración intratecal o intracerebroventricular. El

40 compuesto activo puede administrarse solo o preferiblemente formularse como una composición farmacéutica. Una cantidad eficaz para tratar una cierta enfermedad o trastorno que expresa el antígeno reconocido por el dominio de unión a proteínas depende de los factores usuales como la naturaleza y la gravedad del trastorno que se está tratando y el peso del mamífero. Sin embargo, una dosis unitaria estará normalmente en el rango de 0,1 mg a 1 g, por ejemplo, de 0,1 a 500 mg, por ejemplo, de 0,1 a 50 mg o de 0,1 a 2 mg de dominio de unión a proteínas o una

45 composición farmacéutica del mismo. Normalmente se administrarán las dosis unitarias una vez al mes, una vez a la semana, bisemanalmente, una vez o más de una vez al día, por ejemplo 2, 3, o 4 veces al día, más normalmente de 1 a 3 veces al día. Se prefiere inmensamente que el dominio de unión a proteínas o una composición farmacéutica del mismo se administre en la forma de una composición de dosis unitaria, tal como una composición de dosis unitaria oral, parenteral o inhalada. Tales composiciones se preparan mediante mezcla y se adaptan

50 adecuadamente para la administración oral, inhalada o parenteral, y como tales pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, preparaciones líquidas orales, polvos, gránulos, pastillas, polvos reconstituibles, soluciones inyectables e infusibles o suspensiones o supositorios o aerosoles. Los comprimidos y las cápsulas para la administración oral se presentan normalmente en una dosis unitaria y contienen excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, productos de relleno, diluyentes, agentes de fabricación de comprimidos, lubricantes,

desintegrantes, colorantes, saborizantes y agentes humectantes. Los comprimidos pueden recubrirse según métodos bien conocidos en la técnica. Los productos de relleno adecuados para el uso incluyen celulosa, manitol, lactosa y otros agentes similares. Los desintegrantes adecuados incluyen almidón, polivinilpirrolidona y derivados del almidón como el almidón glicolato sódico. Los lubricantes adecuados incluyen, por ejemplo, estearato de magnesio. Los agentes humectantes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen laurilsulfato sódico. Estas composiciones orales sólidas se pueden preparar por métodos convencionales de mezcla, relleno, fabricación de comprimidos o similares. Se pueden usar operaciones de mezcla repetidas para distribuir el agente activo en todas aquellas composiciones utilizando grandes cantidades de productos de relleno. Tales operaciones son, por supuesto, convencionales en la técnica. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, soluciones, emulsiones, jarabes, elixires o suspensiones oleosas o acuosas o se pueden presentar como un producto seco para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de usar. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, jarabe, metilcelulosa, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio o grasas comestibles hidrogenadas, agentes emulsionantes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitán o acacia; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, ésteres oleaginosos tales como ésteres de glicerina, propilenglicol o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico y, si se desea, agentes saborizantes o colorantes convencionales. Las formulaciones orales incluyen también formulaciones de liberación prolongada convencionales, tales como comprimidos o gránulos con un revestimiento entérico. Preferiblemente, las composiciones para inhalación se presentan para la administración a las vías respiratorias como un rapé o un aerosol o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflación, solo o en combinación con un portador inerte tal como la lactosa. En tal caso, las partículas de compuesto activo tienen adecuadamente diámetros de menos de 50 micras, preferiblemente menos de 10 micras, por ejemplo, entre 1 y 5 micras, tal como entre 2 y 5 micras. Una dosis inhalada favorecida estará en el rango de 0,05 a 2 mg, por ejemplo, de 0,05 a 0,5 mg, de 0,1 a 1 mg o de 0,5 a 2 mg. Para la administración parenteral, se preparan formas de dosis unitaria fluidas con un compuesto descrito en la presente y un vehículo estéril. El compuesto activo, en función del vehículo y la concentración, puede estar o suspendido o disuelto. Las soluciones parenterales se preparan normalmente disolviendo el compuesto en un vehículo y esterilizando con filtro antes de meterlas en un frasco o ampolla adecuado y sellarlo. Ventajosamente, los adyuvantes tales como un anestésico local, conservantes y agentes tamponadores se disuelven también en el vehículo. Para mejorar la estabilidad, la composición se puede congelar después de meterla en el frasco y eliminar el agua al vacío. Las suspensiones parenterales se preparan sustancialmente de la misma manera excepto que el compuesto se suspende en el vehículo en vez de disolverse y esterilizarse por exposición a óxido de etileno antes de suspenderlo en el vehículo estéril. Ventajosamente, se incluye en la composición un surfactante o agente humectante para facilitar la distribución uniforme del compuesto activo. Cuando proceda, pueden incluirse cantidades pequeñas de broncodilatadores, por ejemplo, aminas simpaticomiméticas tales como la isoprenalina, la isoeutarina, el salbutamol, la fenilefrina y la efedrina; derivados de la xantina tales como la teofilina y la aminofilina y corticosteroides tales como la prednisolona y estimulantes suprarrenales tales como la ACTH. Como es práctica común, las composiciones estarán acompañadas usualmente por direcciones escritas o impresas para usar en el tratamiento médico en cuestión.

[0125] La administración de dominios de unión a proteínas, en particular nanocuerpos, en las células se puede realizar como se describe para péptidos, polipéptidos y proteínas. Si el antígeno es extracelular o un dominio extracelular, el dominio de unión a proteínas puede ejercer su función uniéndose a este dominio, sin necesidad de una administración intracelular. Los dominios de unión a proteínas como se describe en la presente pueden dirigirse a epítomos conformacionales intracelulares de los GPCR de interés. Para usar estos dominios de unión a proteínas como tratamientos eficaces y seguros dentro de una célula, la administración intracelular se puede mejorar mediante sistemas de administración o transducción de proteínas conocidos en la técnica. Los dominios de transducción de proteínas (PTD) han atraído un interés considerable en el campo de la administración de fármacos por su capacidad para transponerse a través de membranas biológicas. Los PTD son secuencias relativamente cortas (1-35 aminoácidos) que confieren esta actividad de translocación aparente a las proteínas y otras cargas macromoleculares a las que están conjugadas, fusionadas o con las que forman complejos (Sawant y Torchilin 2010). El péptido TAT derivado del VIH (YGRKKRRQRRR), por ejemplo, se ha usado ampliamente para la administración intracelular de varios agentes que varían desde moléculas pequeñas hasta proteínas, péptidos, rango de nanoportadores farmacéuticos y agentes de obtención de imágenes. Alternativamente, también pueden usarse mecanismos endocíticos mediados por receptores para la administración intracelular de fármacos. Por ejemplo, la vía de internalización mediada por receptores de transferrina es una vía de absorción celular eficiente que se ha aprovechado para la administración específica de sitio de fármacos y proteínas (Qian et al. 2002). Esto se consigue tanto químicamente por conjugación de transferrina con fármacos o proteínas terapéuticos como genéticamente por infusión de péptidos o proteínas terapéuticos en la estructura de transferrina. Las proteínas que existen naturalmente (tales como la proteína de unión al hierro transferrina) son muy útiles en esta área de dirección de fármacos, ya que estas proteínas son biodegradables, no tóxicas y no inmunógenas. Además, pueden conseguir la dirección específica de sitio debido a las altas cantidades de sus receptores presentes en la superficie celular. Todavía otros sistemas de administración incluyen, sin el fin de ser limitativos, sistemas de administración basados en polímeros y liposomas.

[0126] La eficacia de los dominios de unión a proteínas como se describe en la presente, y de composiciones que comprenden los mismos, se puede evaluar usando cualquier ensayo *in vitro*, ensayo en células, ensayo *in vivo* y/o modelo animal adecuados conocidos *per se*, o cualquier combinación de los mismos, en función de la enfermedad o trastorno específico implicado.

- 5 [0127] Se describe además en la presente el uso del dominio de unión a proteínas o la composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente para modular la actividad de señalización de GPCR.

[0128] Los dominios de unión a proteínas como se describe en la presente pueden unirse al GPCR para activar o aumentar la señalización del receptor; o alternativamente para reducir o inhibir la señalización del receptor. Los dominios de unión a proteínas como se describe en la presente también pueden unirse al GPCR de manera que bloquean la actividad constitutiva del GPCR. Los dominios de unión a proteínas como se describe en la presente también pueden unirse al GPCR de manera que medien la modulación alostérica (por ejemplo, se unen al GPCR en un sitio alostérico). De esta manera, los dominios de unión a proteínas pueden modular la función del receptor uniéndose a diferentes regiones en el receptor (por ejemplo, en sitios alostéricos). Se hace referencia por ejemplo a George et al. (2002), Kenakin (2002) y Rios et al. (2001). Los dominios de unión a proteínas como se describe en la presente también pueden unirse al GPCR de manera que prolonguen la duración de la señalización mediada por GPCR o que mejoren la señalización del receptor por aumento de la afinidad receptor-ligando. Además, los dominios de unión a proteínas como se describe en la presente también pueden unirse al GPCR de manera que inhiban o mejoren el ensamblaje de homómeros o heterómeros funcionales de GPCR.

20 [0129] En un ejemplo particular, el dominio de unión a proteínas o la composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente bloquea la señalización mediada por proteínas G.

[0130] En otro ejemplo, el dominio de unión a proteínas o la composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente se prevé para usar en el tratamiento de una enfermedad relacionada con los GPCR, tal como cáncer, enfermedad autoinmune, enfermedad infecciosa, enfermedad neurológica, enfermedad cardiovascular.

25 [0131] Algunos de los dominios de unión a proteínas descritas anteriormente pueden tener utilidad terapéutica y se pueden administrar a un sujeto que tiene una afección para tratar al sujeto para la afección. La utilidad terapéutica para un dominio de unión a proteínas puede determinarse por el GPCR al que se une el dominio de unión a proteínas, ya que la señalización a través de ese GPCR está vinculada a la afección. En ciertos casos, el GPCR se puede activar en la afección por unión a un ligando. En otros ejemplos, el GPCR se puede mutar para volverlo constitutivamente activo, por ejemplo. Se puede emplear un dominio de unión a proteínas en cuestión para el tratamiento de una afección mediada por GPCR tal como esquizofrenia, cefalea migrañosa, reflujo, asma, broncoespasmo, hipertrofia prostática, úlceras, epilepsia, angina, alergia, rinitis, cáncer, por ejemplo, cáncer de próstata, glaucoma y accidente cerebrovascular. Otras afecciones relacionadas con los GPCR ejemplares en la base de datos On-line Mendelian Inheritance in Man encontrada en el sitio *web* mundial del NCBI. Así, también se prevé en la presente el uso de un dominio de unión a proteínas o de una composición farmacéutica para el

35 [0132] En un ejemplo más específico, el dominio de unión a proteínas puede unirse al receptor β 2-adrenérgico, en cuyo caso se puede emplear en el tratamiento de una afección que requiere la relajación del músculo liso del útero o el sistema vascular. Tal dominio de unión a proteínas se puede usar así para la prevención o alivio de los dolores del parto prematuros en el embarazo o en el tratamiento del asma crónico o agudo, la urticaria, la psoriasis, la rinitis, la conjuntivitis alérgica, la actinitis, la fiebre del heno o la mastocitosis, afecciones que han sido vinculadas al β 2-adrenorreceptor. En estos ejemplos, el dominio de unión a proteínas se puede emplear como agentes coterapéuticos para usar en combinación con otras sustancias farmacológicas tales como sustancias farmacológicas antiinflamatorias, broncodilatadoras o antihistamínicas, particularmente en el tratamiento de enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias tales como las mencionadas anteriormente, por ejemplo como potenciadores de la actividad terapéutica de tales fármacos o como un medio de reducción de la dosificación requerida o los efectos secundarios potenciales de tales fármacos. Un dominio de unión a proteínas en cuestión se puede mezclar con la otra sustancia farmacológica en una composición farmacéutica fija o se puede administrar por separado, antes, simultáneamente con o después de la otra sustancia farmacológica. En términos generales, estos protocolos implican la administración, a un individuo que sufre una enfermedad o trastorno relacionado con los GPCR, de una cantidad eficaz de un dominio de unión a proteínas que modula un GPCR para modular el GPCR en el huésped y tratar al individuo para el trastorno.

50 [0133] En algunos ejemplos, cuando se desea una reducción en la actividad de un cierto GPCR, pueden administrarse uno o más compuestos que reduzcan la actividad del GPCR, mientras que cuando se desea un aumento en la actividad de un cierto GPCR, pueden administrarse uno o más compuestos que aumenten la actividad de la actividad de GPCR.

[0134] Se puede tratar a una variedad de individuos según los métodos en cuestión. Generalmente, tales individuos son mamíferos o pertenecientes a los mamíferos, donde estos términos se usan en términos generales para describir organismos que se incluyen en la clase de los mamíferos, incluidas las órdenes de los carnívoros (por ejemplo, perros y gatos), los roedores (por ejemplo, ratones, conejillos de Indias y ratas) y los primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés y monos). En muchos ejemplos, los individuos serán humanos. Los métodos de tratamiento en cuestión se realizan típicamente en individuos con tales trastornos o en individuos con un deseo de evitar tales trastornos.

[0135] El dominio de unión a proteínas o el complejo como se describe en la presente también puede ser útil para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad relacionada con los GPCR, tal como cáncer, enfermedad autoinmune, enfermedad infecciosa, enfermedad neurológica, enfermedad cardiovascular.

Identificación de compuestos dirigidos selectivamente a un GPCR en un estado conformacional funcional

[0136] En el proceso de cribado de compuestos, optimización de cabezas de serie y descubrimiento de fármacos, hay un requisito para ensayos de cribado más rápidos, más eficaces, menos costosos y especialmente ricos en información que proporcionen información simultánea sobre varias características de compuestos y sus efectos sobre varias vías celulares (es decir, eficacia, especificidad, toxicidad y metabolismo de fármacos). Por tanto, existe una necesidad de cribar rápida y económicamente gran número de compuestos para identificar nuevos ligandos específicos de un GPCR de interés, preferiblemente ligandos específicos de conformación, que pueden ser potenciales nuevos candidatos de fármacos. La presente invención resuelve este problema proporcionando nanocuerpos que estabilizan y/o bloquean un GPCR en un estado conformacional activo que pueden luego usarse como inmunógenos o reactivos de selección para el cribado en una variedad de contextos. Una ventaja principal de los dominios de unión a proteínas como se describe en la presente es que un GPCR se puede mantener en una conformación funcional estabilizada, preferiblemente en una conformación de estado activo. Por ejemplo, los compuestos de bibliotecas que se unen selectivamente a esta conformación activa del receptor tienen una propensión más alta a comportarse como agonistas debido a que la estabilización ortoestérica o alostérica de la conformación activa del GPCR provoca respuestas biológicas. Otra ventaja es que el dominio de unión a proteínas aumenta la termoestabilidad de la conformación activa del GPCR, que protege así el GPCR contra la desnaturalización irreversible o térmica inducida por las condiciones no nativas usadas en el cribado de compuestos y el descubrimiento de fármacos, sin la necesidad de depender de GPCR mutantes con una estabilidad aumentada. Otra ventaja principal de la unión a proteínas selectivas de conformación como se describe en la presente es que permiten rápidamente y de una forma fiable cribar y diferenciar entre agonistas, agonistas inversos, antagonistas y/o moduladores de los receptores, así como inhibidores de los GPCR y vías dependientes de GPCR, aumentando así la probabilidad de identificar un ligando con las propiedades farmacológicas deseadas.

[0137] Para ilustrar esto adicionalmente, es un concepto bien establecido que la mayoría de los GPCR exhiben una mayor afinidad de unión a un agonista cuando están en complejo con una proteína G. Esto se atribuye a la interacción cooperativa entre el receptor ocupado por un agonista y la proteína G (Delean et al. 1980). Los dominios de unión a proteínas como se describe en la presente, en particular los nanocuerpos, son capaces de estabilizar un estado conformacional activo de un GPCR (y, por tanto, muestran un comportamiento similar a proteínas G) y desestabilizar estados conformacionales inactivos, aumentando así la afinidad del GPCR por agonistas y disminuyendo la afinidad por agonistas inversos o antagonistas. De ello se deduce que los dominios de unión a proteínas, tales como nanocuerpos, como se describe en la presente que reconocen la conformación funcional activa del GPCR pueden usarse eficazmente en ensayos de cribado de alto rendimiento para cribar agonistas, porque aumentan la afinidad del receptor por agonistas con respecto a agonistas inversos o antagonistas. De manera recíproca, los dominios de unión a proteínas, en particular nanocuerpos, que estabilizan la conformación de estado inactivo de un GPCR aumentarán la afinidad por un agonista inverso o un antagonista y reducirán la afinidad por un agonista. Tales dominios de unión a proteínas pueden, por ejemplo, usarse para cribar agonistas inversos. Por tanto, se prevén también en la presente dominios de unión a proteínas, particularmente nanocuerpos, que reconocen estados conformacionales funcionales particulares, modulando así las afinidades por agonistas y agonistas inversos de una manera recíproca.

[0138] Así, se describe además en la presente el uso de los dominios de unión a proteínas, o los complejos, o las composiciones celulares, todos como se ha descrito anteriormente, en los programas de cribado y/o identificación de parejas de unión específica de conformación de un GPCR, que, en última instancia, pueden conducir a potenciales nuevos candidatos de fármacos.

[0139] Se prevé en la presente un método de identificación de compuestos capaces de unirse selectivamente a un estado conformacional funcional de un GPCR, donde dicho método comprende los pasos de:

- (i) proporcionar un GPCR y un dominio de unión a proteínas capaz de unirse específicamente a un estado conformacional funcional de dicho GPCR como se describe en la presente, y

- (ii) proporcionar un compuesto de prueba, y
- (iii) evaluar si el compuesto de prueba se une al estado conformacional funcional del GPCR, y
- (iv) seleccionar un compuesto que se une selectivamente al estado conformacional funcional del GPCR.

5 [0140] Preferiblemente, el método anterior comprende además un paso de formación de un complejo que comprende el dominio de unión a proteínas y el GPCR en un estado conformacional funcional, más preferiblemente en un estado conformacional activo.

[0141] Así, también se prevé en la presente un método de identificación de compuestos capaces de unirse selectivamente a un estado conformacional funcional de un GPCR, donde dicho método comprende los pasos de:

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

15 [0142] Preferiblemente, el dominio de unión a proteínas como se usa en cualquiera de los métodos anteriores es capaz de estabilizar y/o inducir un estado conformacional funcional de un GPCR tras la unión. Preferiblemente, dicho estado conformacional funcional de un GPCR se selecciona del grupo que consiste en un estado conformacional basal o un estado conformacional activo o un estado conformacional inactivo (como se ha definido anteriormente). Más preferiblemente, dicho estado conformacional funcional de un GPCR es un estado conformacional activo.

20 [0143] Preferiblemente, el dominio de unión a proteínas como se usa en cualquiera de los métodos de cribado anteriores comprende una secuencia de aminoácidos que comprende 4 regiones marco y 3 regiones determinantes de la complementariedad, o cualquier fragmento adecuado de las mismas. Preferiblemente, dicho dominio de unión a proteínas deriva de un anticuerpo de camélido. Más preferiblemente, dicho dominio de unión a proteínas comprende una secuencia de nanocuerpo o cualquier fragmento adecuado de la misma. En particular, dicho
25 nanocuerpo comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-29 o cualquier fragmento adecuado de las mismas.

[0144] Otras preferencias para los dominios de unión a proteínas y/o los complejos son tal y como se ha definido anteriormente.

30 [0145] En un ejemplo preferido, el dominio de unión a proteínas, el GPCR o el complejo que comprende el dominio de unión a proteínas y el GPCR, como se usa en cualquiera de los métodos de cribado anteriores, se proporcionan como células enteras o extractos (de orgánulos) celulares tales como extractos de membranas o fracciones de las mismas, o se pueden incorporar en capas lipídicas o vesículas (que comprenden lípidos naturales y/o sintéticos), lipopartículas de alta densidad o cualquier nanopartícula, tales como nanodiscos, o se proporcionan como VLP, de modo que se retiene una funcionalidad suficiente de las respectivas proteínas. Preparaciones de los GPCR
35 formadas a partir de fragmentos de membranas o extractos de membrana-detergente se revisan en detalle en Cooper (2004), incorporada en la presente por referencia. Alternativamente, los GPCR y/o el complejo también se pueden solubilizar en detergentes. Ejemplos no limitativos de preparaciones de receptor solubilizado se proporcionan más adelante en la sección de Ejemplos.

40 [0146] A menudo se preferirá el cribado de alto rendimiento de dianas de GPCR para parejas de unión específica de conformación. Esto se facilitará mediante la inmovilización de un dominio de unión a proteínas como se describe en la presente, un GPCR en un estado conformacional funcional o un complejo que los comprende, sobre un soporte o superficie sólida adecuada que se puede disponer en matrices o, de otro modo, multiplexarse. Los ejemplos no limitativos de soportes sólidos adecuados incluyen perlas, columnas, láminas, chips o placas.

45 [0147] Más particularmente, los soportes sólidos pueden estar en forma particulada (por ejemplo, perlas o gránulos, generalmente usados en columnas de extracción) o de lámina (por ejemplo, membranas o filtros, portaobjetos de vidrio o de plástico, placas de ensayo de microtitulación, varilla de medición, dispositivos de relleno capilar o similares) que pueden ser fibras o tubos planos, plisados o huecos. Las matrices siguientes se proporcionan como ejemplos y no son exhaustivas, tales ejemplos podrían incluir sílice (sílice amorfa porosa), es decir, la serie FLASH de cartuchos que contienen sílice irregular 60A (32-63 μm o 35-70 μm) suministrada por Biotage (una división de Dyax Corp.), soportes de agarosa o poliacrilamida, por ejemplo, el rango de productos de sefarosa suministrados
50 por Amersham Pharmacia Biotech, o los soportes Affi-Gel suministrados por Bio-Rad. Además, hay polímeros macroporosos, tales como los soportes Affi-Prep estables a la presión suministrados por Bio-Rad. Otros soportes que podrían utilizarse incluyen; dextrano, colágeno, poliestireno, metacrilato, alginato de calcio, vidrio de poro controlado, aluminio, titanio y cerámica porosa. Alternativamente, la superficie sólida puede comprender parte de

un sensor dependiente de la masa, por ejemplo, un detector de resonancia de plasmón de superficie. Ejemplos adicionales de soportes disponibles comercialmente se discuten en, por ejemplo, Protein Immobilisation, R.F. Taylor ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1991).

5 [0148] La inmovilización puede ser tanto no covalente como covalente. En particular, la inmovilización o adsorción no covalente sobre una superficie sólida del dominio de unión a proteínas, el GPCR o el complejo que comprende dicho dominio de unión a proteínas y dicho GPCR como se describe en la presente puede ocurrir a través de un recubrimiento de superficie con cualquiera de entre un anticuerpo, o estreptavidina o avidina, o un ion metálico, que reconoce un marcador molecular unido al dominio de unión a proteínas o el GPCR, según técnicas estándar conocidas por la persona experta (por ejemplo, marcador de biotina, marcador de histidina, etc.).

10 [0149] En particular, el dominio de unión a proteínas, el GPCR o el complejo que comprende dicho dominio de unión a proteínas y dicho GPCR, como se describe en la presente, se pueden unir a una superficie sólida por reticulación covalente usando químicas de acoplamiento convencionales. Una superficie sólida puede comprender naturalmente residuos reticulables adecuados para la unión covalente o puede recubrirse o derivatizarse para introducir grupos reticulables adecuados según métodos bien conocidos en la técnica. En un ejemplo particular, se
15 retiene una funcionalidad suficiente de la proteína inmovilizada después de un acoplamiento covalente directo con la matriz deseada a través de una fracción reactiva que no contiene un brazo separador químico. Ejemplos adicionales e información más detallada sobre métodos de inmovilización de (fragmentos de) anticuerpos sobre soportes sólidos se discuten en Jung et al. (2008); de forma similar, se revisan métodos de inmovilización de receptores de membrana en Cooper (2004); ambos se incorporan en la presente por referencia.

20 [0150] Los avances en biología molecular, particularmente a través de mutagénesis dirigida al sitio, permiten la mutación de residuos de aminoácidos específicos en la secuencia de una proteína. La mutación de un aminoácido particular (en una proteína con estructura conocida o inferida) en una lisina o cisteína (u otro aminoácido deseado) puede proporcionar un sitio específico para un acoplamiento covalente, por ejemplo. También es posible rediseñar una proteína específica para alterar la distribución de aminoácidos disponibles superficiales implicados en el
25 acoplamiento químico (Kallwass et al, 1993) en efecto controlando la orientación de la proteína acoplada. Un enfoque similar se puede aplicar a los dominios de unión a proteínas descritos en la presente, así como a los GPCR estabilizados conformacionalmente, ya sea comprendidos o no en un complejo, proporcionando así un medio de inmovilización orientada sin la adición de otras colas de péptidos o dominios que contienen aminoácidos tanto naturales como no naturales. En caso de un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo, tal como un nanocuerpo, se
30 prefiere la introducción de mutaciones en la región marco, minimizando la interrupción de la actividad de unión al antígeno del (fragmento de) anticuerpo.

[0151] Convenientemente, las proteínas inmovilizadas se pueden usar en procesos de inmunoabsorción tales como inmunoensayos, por ejemplo ELISA, o procesos de purificación de inmunoafinidad poniendo en contacto las
35 proteínas inmovilizadas con una muestra de prueba según métodos estándar convencionales en la técnica. Alternativamente, y particularmente para usos de alto rendimiento, las proteínas inmovilizadas se pueden disponer en matrices o, de otro modo, multiplexarse. Preferiblemente, las proteínas inmovilizadas se usan para el cribado y la selección de compuestos que se unen específicamente a un GPCR en un estado conformacional funcional, en particular un GPCR en un estado conformacional activo.

40 [0152] Se apreciará que tanto el dominio de unión a proteínas como el GPCR en un estado conformacional funcional, o el complejo que comprende dicho dominio de unión a proteínas y dicho GPCR, pueden inmovilizarse, en función del tipo de aplicación o el tipo de cribado que sea necesario realizar. Además, la elección del dominio de unión a proteínas que estabiliza GPCR (dirigido a un epítipo conformacional particular del GPCR), determinará la orientación del GPCR y, por consiguiente, el resultado deseado de la identificación de compuestos, por ejemplo,
45 compuestos que se unen específicamente a partes extracelulares, partes intramembranarias o partes intracelulares de dicho GPCR conformacionalmente estabilizado.

[0153] Alternativamente, el compuesto de prueba (o una biblioteca de compuestos de prueba) se puede inmovilizar en una superficie sólida, tal como la superficie de un chip, mientras que el dominio de unión a proteínas, el GPCR o el complejo se proporcionan, por ejemplo, en una solución detergente o en una preparación similar a una membrana.

50 [0154] Más preferiblemente, ni el dominio de unión a proteínas ni el GPCR ni el compuesto de prueba están inmovilizados, por ejemplo, en los protocolos de selección de expresión en fagos en solución o ensayos de unión de radioligandos.

[0155] Se pueden usar varios métodos para determinar la unión entre el GPCR estabilizado y un compuesto de
55 prueba, incluidos, por ejemplo, ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA), ensayos de resonancia de plasmón de superficie, ensayos con chip, inmunocitofluorescencia, tecnología de dos híbridos de levadura y

expresión en fagos que son práctica común en la técnica, por ejemplo, en Sambrook et al. (2001), Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Otros métodos de detección de la unión entre un compuesto de prueba y un GPCR incluyen la ultrafiltración con métodos de espectroscopia de masas con pulverización iónica/HPLC u otros métodos (bio)físicos y analíticos. Los métodos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), por ejemplo, bien conocidos por las personas expertas en la técnica, también se pueden usar. Se apreciará que un compuesto de prueba unido se puede detectar usando un marcador o etiqueta única asociada al compuesto, tal como un marcador peptídico, un marcador de ácido nucleico, un marcador químico, un marcador fluorescente o un marcador de radiofrecuencia, como se describe más adelante en la presente.

[0156] Además de establecer la unión a un GPCR en un estado conformacional funcional, también será deseable determinar el efecto funcional de un compuesto sobre el GPCR. En particular, los dominios de unión a proteínas o los complejos o las composiciones celulares como se describe en la presente se pueden usar para cribar compuestos que modulan (aumentan o reducen) la actividad biológica del GPCR. La modulación deseada en la actividad biológica dependerá del GPCR de elección. Los compuestos que se van a evaluar pueden ser cualquier compuesto químico pequeño o una macromolécula, tal como una proteína, un azúcar, un ácido nucleico o un lípido. Típicamente, los compuestos de prueba serán compuestos químicos pequeños, péptidos, anticuerpos o fragmentos de los mismos. Se apreciará que, en algunos casos, se prefiere un cribado de alto rendimiento de compuestos de prueba y que los métodos descritos anteriormente se pueden usar como un método de "cribado de bibliotecas", un término bien conocido por las personas expertas en la técnica. Así, el compuesto de prueba puede ser una biblioteca de compuestos de prueba. En particular, ensayos de cribado de alto rendimiento de compuestos terapéuticos tales como agonistas, antagonistas o agonistas inversos y/o moduladores forman parte de la invención. Para usos de alto rendimiento, se pueden usar bibliotecas de compuestos tales como bibliotecas de compuestos alostéricos, bibliotecas peptídicas, bibliotecas de anticuerpos, bibliotecas basadas en fragmentos, bibliotecas de compuestos sintéticos, bibliotecas de compuestos naturales, bibliotecas de expresión en fagos y similares. Metodologías para preparar y cribar tales bibliotecas se conocen en la técnica.

[0157] En un ejemplo preferido, los métodos de cribado de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca combinatoria química o peptídica con un gran número de ligandos terapéuticos potenciales. Tales "bibliotecas combinatorias" o "bibliotecas de compuestos" se criban luego en uno o más ensayos, como se describe en la presente, para identificar aquellos miembros de la biblioteca (especies o subclases químicas particulares) que presentan una actividad característica deseada. Una "biblioteca de compuestos" es una colección de sustancias químicas almacenadas usada normalmente en última instancia en el cribado de alto rendimiento. Una "biblioteca combinatoria" es una colección de diversos compuestos químicos generados o por síntesis química o por síntesis biológica combinando una serie de "bloques de construcción" químicos tales como reactivos. La preparación y el cribado de bibliotecas combinatorias son bien conocidos por las personas expertas en la materia. Los compuestos así identificados pueden servir como "compuestos cabeza de serie" convencionales o pueden usarse ellos mismos como tratamientos potenciales o reales. Así, en un ejemplo adicional, los métodos de cribado como se ha descrito en la presente anteriormente comprenden además modificar un compuesto de prueba que se ha demostrado que se une a un GPCR en un estado conformacional funcional, preferiblemente un estado conformacional activo, y determinar si el compuesto de prueba modificado se une al GPCR cuando está en la conformación particular.

[0158] El compuesto de prueba puede proporcionarse como una muestra biológica. En particular, la muestra puede ser cualquier muestra adecuada tomada de un individuo. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de fluido corporal tal como sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo. Alternativamente, la muestra es extracto tisular o celular.

[0159] Los compuestos pueden unirse al GPCR diana dando como resultado la modulación (activación o inhibición) de la función biológica del GPCR, en particular la señalización del receptor aguas abajo. Esta modulación de la señalización del GPCR puede ocurrir orto- o alostéricamente. Los compuestos pueden unirse al GPCR diana para activar o aumentar la señalización del receptor; o alternativamente para reducir o inhibir la señalización del receptor. Los compuestos también pueden unirse al GPCR diana de manera que bloqueen la actividad constitutiva del GPCR. Los compuestos también pueden unirse al complejo diana de manera que medien la modulación alostérica (por ejemplo, se unan al GPCR en un sitio alostérico). De esta manera, los compuestos pueden modular la función del receptor uniéndose a diferentes regiones en el GPCR (por ejemplo, en sitios alostéricos). Se hace referencia por ejemplo a George et al. (2002), Kenakin (2002) y Rios et al. (2001). Los compuestos también pueden unirse al GPCR diana de manera que prolonguen la duración de la señalización mediada por GPCR o que mejoren la señalización del receptor aumentando la afinidad receptor-ligando. Además, los compuestos también pueden unirse al complejo diana de manera que inhiban o mejoren el ensamblaje de homómeros o heterómeros funcionales de GPCR.

[0160] Por ejemplo, se puede determinar si el compuesto altera la unión del GPCR a un ligando del receptor (como se define en la presente). La unión de un GPCR a su ligando se puede evaluar usando métodos de unión de ligando estándar conocidos en la técnica como se describe en la presente. Por ejemplo, un ligando se puede marcar

radiactivamente o marcar fluorescentemente. El ensayo se puede realizar en células enteras o en membranas obtenidas de las células o receptor solubilizado acuoso con un detergente. El compuesto estará caracterizado por su capacidad para alterar la unión del ligando marcado (véase también la sección de Ejemplos). El compuesto puede reducir la unión entre el GPCR y su ligando o puede aumentar la unión entre el GPCR y su ligando, por ejemplo, por un factor de al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 50 veces, 100 veces.

[0161] Así, el complejo como se usa en cualquiera de los métodos de cribado anteriores puede comprender además un ligando del receptor. Preferiblemente, el ligando del receptor se elige del grupo que comprende una molécula pequeña, un polipéptido, un anticuerpo o cualquier fragmento derivado del mismo, un producto natural y similares. Más preferiblemente, el ligando del receptor es un agonista completo o un agonista parcial o un agonista inverso o un antagonista, como se ha descrito anteriormente.

[0162] Los dominios de unión a proteínas como se describe en la presente, particularmente los nanocuerpos, pueden ser también útiles para la identificación de cabezas de serie y el diseño de peptidomiméticos. El uso de un péptido biológicamente pertinente o una estructura proteica como punto de partida para la identificación de cabezas de serie representa uno de los enfoques más potentes en el descubrimiento de fármacos moderno. Los peptidomiméticos son compuestos cuyos elementos esenciales (farmacóforo) imitan un péptido natural o una proteína en espacio 3D y que retienen la capacidad para interactuar con la diana biológica y producen el mismo efecto biológico. Los peptidomiméticos se diseñan para eludir algunos de los problemas asociados a un péptido natural: por ejemplo, la estabilidad contra la proteólisis (duración de la actividad) y una mala biodisponibilidad. Ciertas otras propiedades, tales como la selectividad o la potencia del receptor, a menudo pueden mejorarse sustancialmente. Por medio de un ejemplo no limitativo, los nanocuerpos de la presente invención pueden unirse con bucles de CDR largos profundamente en el núcleo del receptor para ejercer un efecto biológico. Estos péptidos y sus estructuras concomitantes en el complejo de nanocuerpo-GPCR pueden servir como puntos de partida para la identificación de cabezas de serie y el diseño de peptidomiméticos.

[0163] Por consiguiente, los dominios de unión a proteínas, en particular los nanocuerpos de la presente invención, pueden ser útiles en ensayos de cribado. Los ensayos de cribado para el descubrimiento de fármacos pueden ser ensayos en fase sólida o en fase de solución, por ejemplo, un ensayo de unión, tal como ensayos de unión de radioligandos. En ensayos de alto rendimiento, resulta posible cribar hasta varios miles de moduladores o ligandos diferentes en un único día en formatos de 96, 384 o 1536 pocillos. Por ejemplo, cada pocillo de una placa de microtitulación se puede usar para ejecutar un ensayo separado contra un modulador potencial seleccionado o, si se van a observar los efectos de la concentración o el período de incubación, cada 5-10 pocillos pueden probar un único modulador. Así, una única placa de microtitulación estándar puede analizar aproximadamente 96 moduladores. Resulta posible analizar muchas placas por día; hoy son posibles cribados de ensayo de hasta aproximadamente 6.000, 20.000, 50.000 o más compuestos diferentes.

[0164] Además, los dominios de unión a proteínas, tales como los nanocuerpos de la presente invención, también pueden ser útiles en ensayos en células. Los ensayos en células son también críticos para la valoración del mecanismo de acción de nuevas dianas biológicas y la actividad biológica de compuestos químicos. Los ensayos en células actuales para los GPCR incluyen medidas de la activación de vías (liberación de Ca^{2+} , generación de cAMP o actividad transcripcional); mediciones del tráfico de proteínas marcando GPCR y elementos aguas abajo con GFP; y medidas directas de interacciones entre proteínas usando transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET), transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) o enfoques de dos híbridos de levadura. La introducción de los dominios de unión a proteínas, en particular los nanocuerpos de la presente invención, dentro de la célula en el compartimento pertinente de la célula (intra- o extracelularmente) por cualquier medio bien conocido y comúnmente usado en la técnica, puede conducir a nuevos o mejores ensayos en células.

[0165] En particular, existe una necesidad de "desorfanar" aquellos GPCR para los que no se ha identificado un ligando de activación natural. La estabilización de los GPCR en un estado conformacional funcional usando los dominios de unión a proteínas como se describe en la presente permite enfoques de cribado que se pueden usar para identificar ligandos de los GPCR "huérfanos" donde se desconoce el ligando natural. Se pueden identificar ligandos de GPCR huérfanos a partir de muestras biológicas tales como sangre o extracto tisular o a partir de bibliotecas de ligandos. Por ejemplo, se han adoptado varios enfoques para la "desorfanización", incluido el cribado de matrices contra familias de ligandos conocidos.

[0166] La eficacia de los compuestos y/o las composiciones que comprenden los mismos se puede evaluar usando cualquier ensayo *in vitro*, ensayo en células, ensayo *in vivo* y/o modelo animal adecuados conocidos *per se*, o cualquier combinación de los mismos, en función de la enfermedad o trastorno específico implicado.

[0167] Por consiguiente, en un ejemplo específico, se proporcionan un soporte sólido en el que se inmoviliza un dominio de unión a proteínas como se describe en la presente y/o un complejo que comprende un dominio de unión

a proteínas y un GPCR en un estado conformacional funcional como se describe en la presente para usar en cualquiera de los métodos de cribado anteriores.

[0168] El compuesto de prueba como se usa en cualquiera de los métodos de cribado anteriores se puede seleccionar del grupo que comprende un polipéptido, un péptido, una molécula pequeña, un producto natural, un peptidomimético, un ácido nucleico, un lípido, lipopéptido, un carbohidrato, un anticuerpo o cualquier fragmento derivado del mismo, tal como Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv enlazados por disulfuro (dsFv) y fragmentos que comprenden un dominio o VL o VH, un anticuerpo de cadena pesada (hcAb), un anticuerpo de dominio único (sdAb), un minicuerpo, el dominio variable derivado de anticuerpos de cadena pesada de camélidos (VHH o nanocuerpo), el dominio variable de los nuevos receptores de antígenos derivados de anticuerpos de tiburón (VNAR), un andamio de proteína incluyendo un cuerpo alfa, proteína A, proteína G, dominios de repetición de anquirina diseñados (DARPs), repeticiones de fibronectina tipo III, anticalinas, knotinas, dominios CH2 diseñados (nanoanticuerpos), como se ha definido anteriormente.

[0169] El compuesto de prueba puede unirse opcionalmente de manera covalente o de manera no covalente a un marcador detectable. Los marcadores detectables adecuados y las técnicas para unirlos, usarlos y detectarlos estarán claros para la persona experta e incluyen, pero de forma no limitativa, cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles incluyen perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads), tintes fluorescentes (por ejemplo, todos los tintes Alexa Fluor, isotiocianato de fluoresceína, rojo de Texas, rodamina, proteína verde fluorescente y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o perlas coloreadas de vidrio o plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Los medios de detección de tales marcadores son bien conocidos por las personas expertas en la materia. Así, por ejemplo, los radiomarcadores se pueden detectar usando película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes se pueden detectar usando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Los marcadores enzimáticos se detectan típicamente proporcionando la enzima con un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan visualizando sencillamente el marcador coloreado. Otros marcadores detectables adecuados se describieron anteriormente en el contexto de un dominio de unión a proteínas.

[0170] Preferiblemente, el compuesto de prueba es un anticuerpo o cualquier fragmento derivado del mismo, como se ha descrito anteriormente, incluido un nanocuerpo. Por ejemplo, y sin el fin de ser limitativo, el compuesto de prueba puede ser un anticuerpo (como se define en la presente en su más amplio sentido) que se ha generado contra un complejo que comprende un dominio de unión a proteínas descrito en la presente y un GPCR (incluidas variantes, como se ha descrito anteriormente) en un estado conformacional funcional, preferiblemente en un estado conformacional activo. Métodos para generar anticuerpos *in vivo* se conocen en la técnica. Preferiblemente, la inmunización de un animal se hará de una manera similar a como se ha descrito anteriormente en la presente (inmunización con GPCR en presencia de ligando del receptor; véase también la sección de Ejemplos) con un GPCR en presencia de un dominio de unión a proteínas que estabiliza el estado conformacional funcional, más preferiblemente un dominio de unión a proteínas que estabiliza el estado activo. También se describen en la presente métodos para seleccionar anticuerpos específicos para un GPCR en un estado conformacional funcional, preferiblemente un estado conformacional activo, que implican el cribado de bibliotecas de expresión que codifican genes de inmunoglobulina, o partes de los mismos, expresados en bacterias, levadura, fagos filamentosos, ribosomas o subunidades ribosómicas u otros sistemas de expresión en un complejo que contiene un GPCR y un dominio de unión a proteínas que estabiliza un estado conformacional funcional del GPCR.

[0171] Se describe además en la presente un kit que comprende un dominio de unión a proteínas o un complejo o una composición celular como se describe en la presente. El kit puede comprender además una combinación de reactivos tales como tampones, marcadores moleculares, construcciones de vectores, material de muestra de referencia, así como unos soportes sólidos adecuados, y similares. Tal kit puede ser útil para cualquiera de las aplicaciones como se describe en la presente. Por ejemplo, el kit puede comprender (una biblioteca de) compuestos de prueba útiles para aplicaciones de cribado de compuestos.

[0172] Finalmente, se prevé en la presente el uso de cualquier dominio de unión a proteínas como se describe en la presente para aislar secuencias de aminoácidos que son responsables de la unión específica a un epítipo conformacional de un estado conformacional funcional de un GPCR, en particular un estado conformacional activo de un GPCR, y para construir dominios de unión a proteínas artificiales basados en dichas secuencias de aminoácidos. Se apreciará que, en los dominios de unión a proteínas como se describe en la presente, las regiones marco y las regiones determinantes de la complementariedad son conocidas y el estudio de derivados del dominio de unión a proteínas, que se unen al mismo epítipo conformacional de un estado conformacional funcional de un GPCR, en particular un estado conformacional activo de un GPCR, permitirá deducir los aminoácidos esenciales implicados en la unión de dicho epítipo conformacional. Este conocimiento se puede usar para construir un dominio de unión a proteínas mínimo y para crear derivados del mismo, lo que puede hacerse rutinariamente por técnicas conocidas por la persona experta en la técnica.

[0173] Los siguientes ejemplos pretenden promover una comprensión mayor de la presente invención. Aunque la presente invención se describe en la presente con referencia a formas de realización ilustradas, debe entenderse que la invención no se limita a las mismas.

[0174] Por lo tanto, la presente invención está limitada solo por las reivindicaciones adjuntas en la presente.

5 EJEMPLOS

Dominios de unión a proteínas que estabilizan estados conformacionales funcionales del β_2 AR humano

Ejemplo 1. Inmunización, construcción de biblioteca y cribado inicial

[0175] Para obtener nanocuerpos madurados *in vivo* contra β_2 AR, una llama (*Llama glama*) fue inmunizada con β_2 AR recombinante truncado en la Gly365 (β_2 AR-365) para excluir una respuesta inmunitaria al carboxilo terminal. El β_2 AR-365 se expresó en células de insecto y el antígeno se reconstituyó tal y como se ha descrito anteriormente (Day et al, 2007). Después de seis administraciones semanales del receptor unido a agonista truncado reconstituido, se aislaron linfocitos de la sangre de la llama inmunizada y se preparó y cribó una biblioteca de fagos como se describe en Materiales y métodos para los ejemplos (véase más adelante). Dos cribados identificaron nanocuerpos conformacionales que reconocen el β_2 AR nativo, pero no el receptor desnaturalizado.

15 Ejemplo 2. Selección de nanocuerpos específicos conformacionales mediante ELISA

[0176] En un primer cribado comparamos la unión de los nanocuerpos sobre el antígeno de β_2 AR nativo y desnaturalizado por calor en un ELISA. Para cada nanocuerpo, se recubrió un pocillo con vesículas fosfolipídicas que contenían β_2 AR-365 unido a agonista (0,1 μ g de proteína/pocillo). A continuación, esta placa se incubó a 80°C durante 2 h. A continuación, otro pocillo de la misma placa se recubrió con vesículas fosfolipídicas que contenían β_2 AR-365 unido a agonista (0,1 μ g de proteína/pocillo) sin calentar. Todos los nanocuerpos fueron capaces de unirse selectivamente al receptor nativo, pero no al receptor inactivado por calor, lo que indica que 16 ligantes reconocen epítomos conformacionales.

Ejemplo 3. Selección de nanocuerpos específicos conformacionales por transferencia puntual

[0177] En un cribado posterior comparamos la especificidad de los nanocuerpos por un receptor β_2 AR unido a agonista nativo, frente a un receptor unido a agonista inverso nativo, frente a un receptor desnaturalizado por SDS por análisis de transferencia puntual. El cribado identificó 16 nanocuerpos conformacionales diferentes que reconocen el β_2 AR-365 unido a agonista nativo, pero no el agonista inverso, o el receptor desnaturalizado por calor (Fig. 2 (transferencias puntuales)).

Ejemplo 4. Selección de nanocuerpos con comportamiento similar a proteínas G

[0178] El cribado inicial identificó 16 clones que reconocieron el β_2 AR unido a agonista nativo, pero no el receptor desnaturalizado por calor. Nuestro siguiente objetivo fue identificar nanocuerpos que tenían un comportamiento similar a proteínas G. El β_2 AR se acopla preferentemente a G_s y la unión de un agonista mejora las interacciones de proteínas G. Además, en presencia de G_s , el β_2 AR se une a agonista con una afinidad más alta. Por lo tanto, miramos (1) el efecto del agonista sobre la unión de nanocuerpos al β_2 AR usando la cromatografía de exclusión por tamaño, (2) el efecto de nanocuerpos sobre la afinidad de unión a un agonista de β_2 AR en membranas y (3) el efecto de nanocuerpos sobre cambios conformacionales de β_2 AR monitoreados por el fluoróforo sensible al entorno mono-bromo bimano (mBBr).

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

[0179] Nanocuerpos purificados se incubaron con receptor β_2 AR solubilizado con detergente purificado en presencia de un agonista o un agonista inverso que estabiliza una conformación inactiva. La mezcla se analizó luego por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), que separa proteínas en función del tamaño. Siete de los nanocuerpos se unieron al β_2 AR purificado y migraron como un complejo en la SEC solo en presencia de agonista y no un agonista inverso (un ejemplo se muestra en las Fig. 1A, Fig. 3 y Fig. 4). Los nanocuerpos restantes no se unieron con suficiente alta afinidad para desplazar la movilidad del β_2 AR en la SEC.

Ejemplo 6. Los nanocuerpos con comportamiento similar a proteínas G mejoran la afinidad del β_2 AR por los agonistas.

[0180] Muchos GPCR exhiben una afinidad de unión a un agonista más alta cuando están en complejo con una proteína G. Esto se atribuye a la interacción cooperativa entre el receptor ocupado por un agonista y la proteína G. Nuestros experimentos de SEC proporcionan evidencia de que 7 nanocuerpos se unen preferentemente al β_2 AR ocupado por un agonista y por lo tanto pueden estabilizar un estado activo de manera similar a la proteína G G_s . Experimentos de unión de competencia de agonista se realizaron en presencia y ausencia de estos 7 nanocuerpos. La afinidad del β_2 AR por el agonista (isoproterenol) se mejoró 2-30 veces en presencia de los nanocuerpos 65, 67, 69, 71, 72, 80 y 84 (Fig. 1B y tabla 1). En cambio, el Nb80 no aumenta la afinidad del β_2 AR o el β_2 AR-T4L por el agonista inverso ICI-118,551 (ICI) (figura 15).

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

[0181] La reciente estructura cristalina de la opsina, así como estudios biofísicos sobre la rodopsina (Park et al. 2008) y el β_2 AR (Yao et al. 2009) muestran que el extremo citoplásmico del segmento transmembranario 6 (TM6) experimenta cambios conformacionales tras la unión de un agonista que son requeridos para el acoplamiento de una proteína G. Para investigar el efecto de los nanocuerpos sobre el movimiento del dominio citoplásmico del TM6 marcamos β_2 AR purificado en la C265 con monobromobimano (mBB- β_2 AR). Mostramos previamente que tanto la unión de un agonista y el acoplamiento de una proteína G indujeron cambios en la fluorescencia del mBB- β_2 AR compatibles con un movimiento hacia el exterior del TM6 (Yao et al. 2008) como se observa en la estructura cristalina de la opsina (Park et al. 2008). En mBB- β_2 AR, la adición de agonista junto con una proteína G resulta en cambios fluorescentes más grandes que o el agonista o la proteína G solos. Esto es compatible con las interacciones cooperativas observadas en los ensayos de unión de competencia de agonista (Yao et al. 2009). De forma similar, se observaron cambios relativamente pequeños en la fluorescencia en mBB- β_2 AR con la adición o del agonista isoproterenol solo o el Nb80 solo; sin embargo, se observaron cambios mayores cuando tanto el agonista como el nanocuerpo se añadieron juntos (Fig. 1C). Se observaron resultados comparables para los nanocuerpos 65, 67, 69, 71, 72 y 84 (Fig. 5).

Ejemplo 8. Caracterización del estado activo del β_2 AR estabilizado con nanocuerpos

[0182] Luego comparamos el efecto del Nb80 con G_s sobre la estructura del β_2 AR y la afinidad de unión a un agonista. El β_2 AR se marcó en el extremo citoplásmico del TM6 en la C265 con monobromobimano y se reconstituyó en partículas de HDL. El TM6 se mueve con respecto al TM3 y el TM5 tras la activación del agonista (Fig. 6A), y hemos mostrado previamente que el entorno alrededor del bimano unido de manera covalente a la C265 cambia tanto con la unión de un agonista como con el acoplamiento de una proteína G, dando como resultado una reducción en la intensidad del bimano y un desplazamiento hacia el rojo en λ_{max} (Yao et al. 2009). El cambio en la fluorescencia del bimano es compatible con movimientos del TM6 similares a los observados en la rodopsina por espectroscopia DEER y en la estructura de la opsina a pH bajo. Como se muestra en la figura 6B, el agonista de catecolamina isoproterenol y la G_s estabilizan ambos una conformación de tipo activo, pero el efecto de la G_s es superior en presencia de isoproterenol, consistente con las interacciones cooperativas del agonista y la G_s sobre la estructura del β_2 AR. El Nb80 solo tiene un efecto sobre la fluorescencia del bimano y λ_{max} del β_2 AR sin ligando esto es similar al de la G_s (Fig. 6C). Este efecto no se observó en el β_2 AR unido al agonista inverso ICI-118,551. El efecto del Nb80 fue aumentado en presencia de 10 μ M de isoproterenol. Estos resultados muestran que el Nb80 no reconoce la conformación inactiva del β_2 AR, pero se une de manera eficaz al β_2 AR ocupado por un agonista y produce un cambio en la fluorescencia del bimano que es indistinguible del observado en presencia de G_s e isoproterenol.

[0183] Las figuras 6D y 6E muestran el efecto de la G_s y el Nb80 sobre la afinidad de agonista para el β_2 AR. El β_2 AR se reconstituyó en partículas de HDL y se realizaron experimentos de unión de competencia de agonista en ausencia o presencia de Nb80 y G_s . En ausencia de cualquiera de las proteínas, el isoproterenol tiene una constante de inhibición (K_i) de 107 nM. En presencia de G_s se observan dos estados de afinidad, porque no todo el β_2 AR está acoplado a G_s . En el estado acoplado a G_s , la afinidad del isoproterenol aumenta 100 veces ($K_i = 1,07$ nM) (Fig. 6D y tabla 4). De forma similar, en presencia de Nb80, la afinidad del isoproterenol aumenta 95 veces ($K_i = 1,13$ nM) (Fig. 6E y tabla 4). Estos datos de unión sugieren que el Nb80 estabiliza una conformación en el β_2 AR WT que es muy similar a la estabilizada por G_s , de manera que el acoplamiento energético de un agonista y la unión de la G_s es imitada fielmente por el Nb80.

[0184] La estructura de alta resolución del estado inactivo del β_2 AR se obtuvo con una proteína de fusión β_2 AR-T4L. Mostramos previamente que β_2 AR-T4L tiene una afinidad más alta para el isoproterenol que el β_2 AR WT (Rosenbaum et al. 2007). Sin embargo, en presencia de Nb80, la afinidad aumentó 60 veces, dando como resultado una afinidad ($K_i = 0,56$ nM) comparable a la del β_2 AR WT unido a Nb80 (Fig. 6F y tabla 4). Aunque no podemos estudiar el acoplamiento de una proteína G en β_2 AR-T4L debido al impedimento estérico por la T4L, los resultados

muestran que la T4L no evita la unión del Nb80, y los valores de K_i casi idénticos para la unión de un agonista a β_2 AR de tipo salvaje y β_2 AR-T4L en presencia de Nb80 sugieren que el Nb80 estabiliza una conformación similar en estas dos proteínas.

Ejemplo 9. Los nanocuerpos facilitan la cristalización del β_2 AR unido a agonista.

[0185] El β_2 AR se cristalizó originalmente unido al agonista inverso carazolol usando dos enfoques diferentes. Los primeros cristales se obtuvieron a partir de β_2 AR unido a un fragmento Fab que reconoció un epítipo compuesto por los extremos amino y carboxilo terminales del tercer bucle intracelular que conecta los TM 5 y 6 (Rasmussen et al. 2007). En el segundo enfoque, el tercer bucle intracelular se sustituyó por lisozima T4 (β_2 AR-T4L) (Rosenbaum et al. 2007). Los esfuerzos para cristalizar el complejo β_2 AR-Fab y β_2 ART4L unidos a diferentes agonistas no consiguieron producir cristales de calidad suficiente para la determinación de la estructura.

[0186] Por lo tanto, nosotros intentamos cristalizar β_2 AR unido a agonista y β_2 AR-T4L en complejo con Nb80. Aunque los cristales de ambos complejos se obtuvieron en bicelas lipídicas y fase cúbica lipídica (LCP), se obtuvo una difracción de alta resolución de cristales de β_2 AR-T4L-Nb80 crecidos en LPC. Estos cristales crecieron a pH 8,0 en PEG400 al 39-44%, 100 mM de Tris, DMSO al 4 % y 1,2,3-heptanotriol al 1%.

Ejemplo 10. El Nb80 contribuye al empaquetamiento del β_7 AR en una red cristalina.

[0187] Se obtuvo una difracción de alta resolución de cristales de β_2 AR-T4L-Nb80 crecidos en LCP. Estos cristales crecieron a pH 8,0 en PEG400 al 39-44%, 100 mM de Tris, DMSO al 4 % y 1,2,3-heptanotriol al 1%.

[0188] Un conjunto de datos combinado a 3,5 Å se obtuvo de 23 cristales (tabla 5). La estructura se resolvió por sustitución molecular usando la estructura del β_2 AR unido a carazolol y un nanocuerpo como modelos de búsqueda. La figura 7 muestra el empaquetamiento del complejo β_2 AR-T4L-Nb80 en la red cristalina. El Nb80 se une al extremo citoplásmico del β_2 AR, con el tercer bucle de la región determinante de la complementariedad (CDR) proyectándose en el núcleo del receptor. Los complejos β_2 AR-nanocuerpo están dispuestos con las bicapas lipídicas aproximadamente paralelas al plano de del cristal. Moléculas de nanocuerpo relacionadas con la simetría doble interactúan a lo largo del eje α para generar una red apretadamente compacta en esta dirección. En la bicapa, las moléculas receptoras interactúan en una disposición antiparalela donde los TM1, 2, 3 y 4 de una molécula de β_2 AR se empaquetan contra los TM4 y 5 de la molécula adyacente. También se forman contactos entre la hélice 8 y el TM5 del vecino de la red paralela a lo largo del eje b, y entre la porción extracelular del TM1 y el extremo citoplásmico del TM6 de un tercer vecino antiparalelo. El empaquetamiento es más débil a lo largo del eje c, que se puede deber en parte a interacciones no específicas de la T4L con el receptor adyacente y/o moléculas de nanocuerpo. No hay densidad electrónica interpretable para la T4L, pero dados los extremos visibles del TM5 y el TM6, la posición de la T4L está altamente restringida. Supuestamente la T4L adopta una serie de orientaciones con respecto al receptor, y quizás un rango de conformaciones internas debido a su movimiento de bisagra (Zhang et al. 1995), que alcanza la media de su densidad. Sin embargo, la T4L posiblemente contribuye a la estructura del cristal, ya que fuimos incapaces de producir cristales del complejo β_2 AR-nanocuerpo nativo bajo estas condiciones, aunque es posible que el bucle flexible que conecta el TM5 y el TM6 en el receptor nativo evite la formación de redes.

Ejemplo 11. Estructura de un estado activo estabilizado por nanocuerpos del β_2 AR.

[0189] La figura 8 compara la estructura del β_2 AR inactivo (a partir de la estructura del β_2 AR-T4L unida al carazolol) con el estado activo del β_2 AR. Las diferencias más grandes se encuentran en la cara citoplásmica del receptor, con desplazamiento hacia el exterior del TM5 y el TM6 y un movimiento hacia el interior del TM7 y el TM3 en el complejo β_2 AR-T4L-Nb80 con respecto a la estructura inactiva (Fig. 8A, B). Hay cambios relativamente pequeños en la superficie extracelular (Fig. 8C). El segundo bucle intracelular (ICL2) entre el TM3 y el TM4 adopta una hélice alfa de dos giros, similar a la observada en la estructura del β_1 AR de pavo (Warne et al. 2008). La ausencia de esta hélice en la estructura del β_2 AR inactivo puede reflejar contactos de la red cristalina que implican el ICL2.

[0190] La figura 9A-C muestra con mayor detalle la interacción del Nb80 con el lado citoplásmico del β_2 AR. Una secuencia de ocho aminoácidos de la CDR 3 penetra en un bolsillo hidrofóbico formado por aminoácidos de los segmentos TM 3, 5, 6 y 7. Una secuencia de cuatro aminoácidos de la CDR1 proporciona interacciones estabilizantes adicionales con extremos citoplásmicos de los segmentos TM 5 y 6. La figura 9 D compara la superficie citoplásmica de conformaciones activas e inactivas del β_2 AR. La CDR3 ocupa una posición similar al péptido carboxilo terminal de la transducina en la opsina (Scheerer et al. 2008) (Fig. 10). La mayoría de interacciones entre el Nb80 y el β_2 AR están mediadas por contactos hidrofóbicos.

[0191] Cuando se comparan las estructuras activas e inactivas, el cambio más grande se observa en el TM6, con un movimiento de 11,4 Å de la hélice en el Glu2686.30 (parte del bloqueo iónico) (los superíndices en esta forma indican la numeración Ballesteros-Weinstein para residuos de GPCR conservados (Ballesteros y Weinstein 1995) (Fig. 9D). Este gran cambio se efectúa por una pequeña rotación en sentido horario del TM6 en el giro precedente a la Pro288^{6.50} conservada, posibilitado por el enlace de hidrógeno de esqueleto interrumpido en la prolina y el reempaquetamiento de la Phe282^{6.44} (véase a continuación), que balancea la hélice hacia fuera.

[0192] Los cambios en el β_2 AR-T4L-Nb80 activo con respecto al β_2 AR-T4L unido a carazolol inactivo son notablemente similares a los observados entre la rodopsina y la opsina (Scheerer et al. 2008; Park et al. 2008) (Fig. 9E, Fig. 10). El puente salino en el bloqueo iónico entre la altamente conservada Arg131^{3.50} y el Asp/Glu130^{3.49} se rompe. En la opsina, la Arg135^{3.50} interactúa con la Tyr223^{5.58} en el TM5 y un carbonilo del esqueleto del péptido de la transducina. La Arg131^{3.50} del β_2 AR asimismo interactúa con un carbonilo del esqueleto de la CDR3 del Nb80. Sin embargo, el Nb80 impide una interacción entre la Arg131^{3.50} y la Tyr219^{5.58}, incluso aunque la tirosina ocupe una posición similar en la opsina y la conformación activa del β_2 AR-T4L-Nb80. Como en la opsina, la Tyr326^{7.53} de la secuencia NPxxY altamente conservada se mueve en el espacio ocupado por el TM6 en el estado inactivo. En el β_2 AR-T4L unido a carazolol inactivo observamos una red de interacciones de enlace de hidrógeno que implica aminoácidos altamente conservados en los TM 1, 2, 6 y 7 y varias moléculas de agua (Rosenbaum et al. 2007). Aunque la resolución del β_2 AR-T4L-Nb80 es inadecuada para detectar aguas, está claro que los cambios estructurales que observamos alterarían sustancialmente esta red.

[0193] A diferencia de los cambios relativamente grandes observados en los dominios citoplásmicos del β_2 AR-T4L-Nb80, los cambios en el bolsillo de unión a un agonista son bastante sutiles. El Trp^{6.48} está altamente conservado en la familia A de los GPCR, y se ha propuesto que su estado rotamérico juega un papel en la activación de los GPCR (interruptor de palanca de rotámeros) (Shi et al. 2002). No observamos ningún cambio en el rotámero de cadena lateral del Trp286^{6.48} en el TM6, que se encuentra cerca de la base del bolsillo de unión a ligandos, aunque su posición se desplaza ligeramente debido a reestructuraciones de residuos cercanos Ile121^{3.40} y Phe282^{6.44}. Aunque hay evidencia espectroscópica de cambios en el entorno del Trp^{6.48} tras la activación de la rodopsina (Ahuja et al. 2009), no se observa un cambio de rotámero en las estructuras cristalinas de la rodopsina y la opsina a pH bajo. Además, experimentos de mutagénesis recientes sobre el receptor de histamina demuestran que no se requiere el Trp^{6.48} para la activación del receptor 5HT4 por la serotonina (Pellissier et al. 2009).

[0194] Resulta interesante especular cómo los cambios pequeños alrededor del bolsillo de unión a un agonista están acoplados a cambios estructurales mucho mayores en las regiones citoplásmicas de los TM 5, 6 y 7 que facilitan la unión del Nb80 y la G_s. Un enlace conformacional potencial se muestra en la figura 11. Las interacciones de agonistas pueden estabilizar una conformación activa del receptor que incluye un movimiento de 2,1 Å hacia el interior del TM5 en la posición 207^{5.46} y un movimiento de 1,4 Å hacia el interior de la Pro211^{5.50} conservada con respecto a la estructura inactiva. En el estado inactivo, las posiciones relativas de los TM5, TM3, TM 6 y TM7 están estabilizadas por interacciones entre la Pro211^{5.50}, la Ile121^{3.40}, la Phe282^{6.44} y la Asn318^{7.45}. La posición de la Pro211^{5.50} observada en el estado activo es incompatible con esta red de interacciones, y la Ile121^{3.40} y la Phe282^{6.44} se reposicionan, donde una rotación del TM6 alrededor de la Phe282^{6.44} conduce a un movimiento hacia el exterior del extremo citoplásmico del TM6.

[0195] Aunque algunos de los cambios estructurales observados en los dominios citoplásmicos del complejo β_2 AR-T4L-Nb80 surgen de interacciones específicas con el Nb80, el hecho de que el Nb80 y la G_s induzcan o estabilicen cambios estructurales similares en el β_2 AR, como se ha determinado por espectroscopia de fluorescencia y por afinidad de unión a un agonista, sugiere que el Nb80 y la G_s reconocen conformaciones similares estabilizadas por agonistas. La observación de que los dominios citoplásmicos de la rodopsina y el β_2 AR experimentan cambios estructurales similares tras la activación proporciona un apoyo adicional a que el β_2 AR-T4L-Nb80 unido a agonista representa una conformación activa y es consistente con un mecanismo conservado de activación de proteínas G.

[0196] Sin embargo, el mecanismo por el que los agonistas inducen o estabilizan estos cambios conformacionales posiblemente difiere para diferentes ligandos y para diferentes GPCR. Los equilibrios conformacionales de la rodopsina y el β_2 AR difieren, como muestra el hecho de que la rodopsina puede adoptar una conformación completamente activa en ausencia de una proteína G mientras que el β_2 AR no puede. Así, la energética de la activación y el muestreo conformacional pueden diferir entre diferentes GPCR, que posiblemente da lugar a la variedad de eficacias de ligandos presentadas por estos receptores. Una necesidad de agonista solo interrumpe una interacción intramolecular clave necesaria para estabilizar el estado inactivo, ya que una actividad constitutiva del receptor puede resultar de mutaciones únicas de aminoácidos de diferentes regiones de los GPCR (Parnot et al. 2002). Así, la interrupción de estas interacciones estabilizantes ya sea por agonistas o por mutaciones reduce la barrera de energía que separa los estados inactivos y activos y aumenta la probabilidad de que un receptor pueda interactuar con una proteína G.

[0197] En conclusión, estos resultados anteriores demuestran la capacidad para generar nanocuerpos que reconocen y estabilizan un estado unido a agonista de un GPCR. En el caso del β_2 AR, este estado estabilizado por

nanocuerpos es similar funcionalmente al estado estabilizado por la proteína G G_s . Finalmente, los nanocuerpos facilitaron la formación de cristales de calidad de difracción. Este enfoque se aplica ahora a otros GPCR y otras proteínas de membrana.

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

[0198] Se pueden usar nanocuerpos que estabilizan el estado activo que son de reacción cruzada con receptores relacionados como una herramienta para estabilizar un estado conformacional de aquellos receptores relacionados. Para demostrar este principio, analizamos si el Nb80 se une selectivamente a la conformación activa del receptor β_1 AR humano. El β_1 AR y el β_2 AR son receptores adrenérgicos estrechamente relacionados. Usando el servidor PISA (Krissinel & Henrick, 2007) y basándose en la estructura cristalina del complejo Nb80- β_2 AR, se identificaron 30 residuos AA del β_2 AR que interactúan con el Nb80 en la interfase β_2 AR-Nb80. Un alineamiento de secuencias de aminoácidos (figura 17) indica que 28 de estos 30 residuos implicados en la interacción con el Nb80 están conservados entre el β_1 AR y el β_2 AR. Los residuos de la interfase restantes son lisinas en el β_2 AR y se han sustituido por argininas en el β_1 AR correspondientes a sustituciones conservadas (mostradas en cajas grises en la figura 17). Por lo tanto, parece que ambos receptores comparten un sitio de unión muy similar para el Nb80. Basándose en este análisis, también medimos el efecto del Nb80 sobre la afinidad del β_1 AR por el agonista isoproterenol y el agonista inverso CGP20712A (figura 18). En cuanto al β_2 AR, el Nb80 también indujo una afinidad aumentada del isoproterenol por el β_1 AR (figura 18, paneles A y C). El Nb80 no cambia la afinidad por el antagonista CGP20712A (figura 18, panel D), que demuestra la estabilización selectiva de la conformación de estado activo del β_1 AR por el Nb80. Ningún tal efecto del Nb80 se observó en receptores no relacionados como el receptor de dopamina D1 (datos no mostrados).

Ejemplo 13. Nanocuerpos que estabilizan el estado activo del β_2 AR son herramientas excelentes para un cribado de agonistas mejorado.

[0199] Muchos GPCR exhiben una afinidad de unión a un agonista más alta cuando están en complejo con proteínas G. Esto se atribuye a la interacción cooperativa entre un receptor ocupado por un agonista y una proteína G. Los nanocuerpos con comportamiento similar a proteínas G mejoran posiblemente la afinidad del β_2 AR por agonistas (véase el ejemplo 6). Este comportamiento puede tener implicaciones importantes en el descubrimiento de nuevos agonistas. Por ejemplo, los Nb con comportamiento similar a proteínas G pueden aumentar la afinidad aparente de los GPCR por agonistas, en comparación con los antagonistas. Esto puede causar un sesgo hacia agonistas entre las coincidencias cuando una biblioteca de compuestos se criba contra tal complejo GPCR-Nb. Para evaluar la aplicabilidad de este enfoque, analizamos el efecto del nanocuerpo que estabiliza el estado activo del β_2 AR Nb80 sobre la interacción del β_2 AR con varios ligandos de β_2 AR bien conocidos en experimentos de unión de radioligandos de competencia (véase Materiales y métodos). Se evaluaron diez agonistas y cinco antagonistas: (-)isoproterenol HCl (agonista), (-)-alprenolol (antagonista), salbutamol (agonista parcial), ICI118551 (agonista inverso), carvedilol (antagonista), CGP12177A (antagonista), salmeterol xinafoato (agonista completo), sal de hemisulfato de terbutalina (agonista parcial), hidrocloreto de dobutamina (agonista parcial), sal de hemisulfato de metaproterenol (agonista), hidrocloreto de procaterol (agonista), hidrocloreto de ritodrina (agonista), hidrobromuro de fenoterol (agonista completo), dihidrato de fumarato de formoterol (agonista) y sal de maleato de timolol (antagonista), todos comprados a través de Sigma Aldrich.

[0200] Experimentos de unión de competencia de ligando se realizaron en presencia y ausencia de 500 nM de Nb80 sobre membranas comerciales que contienen β_2 AR humano en toda su longitud. Se usó 3 H-dihidroalprenolol (DHA) como el radioligando competidor. Ejemplos representativos de experimentos de unión de competencia de ligando se muestran en la figura 16. Para todos los compuestos, se obtuvieron valores IC_{50} en presencia de exceso de Nb80 y se compararon con los IC_{50} obtenidos en presencia de un nanocuerpo irrelevante (control negativo). (Tabla 6). De acuerdo con los ejemplos 6, 8 y 12, observamos un aumento en la potencia para todos los agonistas cuando el β_2 AR está en complejo con el Nb80. Tal efecto no se observa para los antagonistas o los agonistas inversos.

Ejemplo 14. Cribado de biblioteca de compuestos usando un nanocuerpo que estabiliza el estado activo del β_2 AR.

[0201] Bloquear el GPCR en una conformación particular tiene una ventaja sobre el uso de una diana no conformacionalmente estabilizada (que representa un repertorio de conformaciones) en un ensayo de cribado con el objetivo de identificar compuestos contra esa conformación particular, la denominada conformación diana 'tratable con fármacos'. El Nb80 selectivo conformacional permite el uso de receptores de tipo salvaje minimizando en consecuencia el riesgo potencial de cambios conformacionales artificiales como resultado de una mutagénesis dirigida al sitio.

[0202] Para demostrar si el Nb80 facilita la identificación de ligandos que se unen selectivamente al β_2 AR en su conformación activa, una biblioteca de fragmentos consistente en aproximadamente 1500 compuestos de bajo peso molecular (<300 Da) distintos se criba para agonistas usando un ensayo de unión de radioligandos de competencia. Para este ensayo, membranas que contienen β_2 AR en toda su longitud se preincuban con Nb80 o un Nb irrelevante (control negativo) y se añaden a placas de 96 pocillos que contienen compuestos de bibliotecas y 2 nM de radioligando 3 H-dihidroalprenolol (DHA) (véase Materiales y métodos). Los compuestos de bibliotecas que desplazan significativamente el radioligando en la muestra que contiene β_2 AR en complejo con Nb80 en comparación con la muestra que contiene el nanocuerpo irrelevante son compuestos que se unen preferentemente a la conformación activa del receptor. Los compuestos de bibliotecas que se unen selectivamente a la conformación activa del receptor tienen una alta propensión a comportarse como agonistas, porque la estabilización ortoestérica o alostérica de la conformación activa del GPCR provoca respuestas biológicas. Los compuestos de bibliotecas seleccionados tienen que cribarse adicionalmente para agonismo midiendo, por ejemplo, por acoplamiento de una proteína G, eventos de señalización aguas abajo o el rendimiento fisiológico.

Ejemplo 15: termoestabilización del receptor β_2 AR con nanocuerpos.

[0203] Los estudios estructurales y funcionales sobre las proteínas de membrana integrales han sido obstaculizados durante mucho tiempo por su inestabilidad en detergente. Aunque están apareciendo métodos de expresión y purificación que permiten la generación de cantidades de miligramos, conseguir estabilidad con estas moléculas es quizás el impedimento más difícil que hay que superar. La purificación necesita una liberación de la proteína de membrana de la bicapa lipídica por solubilización con detergente, un proceso durante el que las superficies hidrofóbicas de la proteína son recubiertas con monómeros surfactantes para formar un complejo proteína-detergente. Sin embargo, el cinturón de detergente formado alrededor de la proteína es una mala sustitución para la bicapa lipídica. Así, la solubilización de las proteínas de membrana a menudo resulta en desestabilización, despliegue y agregación posterior. La termoestabilización de las proteínas de membrana se puede conseguir a través de mutagénesis dirigida al sitio (Zhou y Bowie, 2000; Magnini et al., 2008). Aquí mostramos que la unión de nanocuerpos selectivos conformacionales representa una alternativa innovadora para la termoestabilización de GPCR solubilizados con detergente.

[0204] El efecto de los nanocuerpos selectivos conformacionales sobre la termoestabilidad y la agregación posterior del receptor β_2 AR se analizó usando un ensayo de estabilidad térmica fluorescente (Fig. 13) y cromatografía de exclusión por tamaño (Fig. 14). Para estos experimentos, se expresó β_2 AR recombinante en células de insecto Sf9, se solubilizó con dodecilmaltósido al 1%, 100 mM de NaCl, 20 mM de Hepes pH 7,5 e inhibidores de proteasa y se purificó por cromatografía de afinidad de M1 FLAG (véase Material en métodos para los ejemplos).

[0205] El ensayo de estabilidad térmica fluorescente hace uso del fluorocromo específico de tiol N-[4-(7-dietilamino-4-metil-3-cumaril)fenil]maleimida (CPM) para medir la reactividad química de las cisteínas nativas incluidas en el interior de la proteína como un sensor para la integridad general del estado plegado de las proteínas de membrana (Alexandrov et al., 2008). Para el ensayo de estabilidad térmica fluorescente, el receptor solubilizado con detergente (en dodecilmaltósido al 0,1%, 100 mM de NaCl y 20 mM de Hepes pH 7,5) se preincubó con isoproterenol (10 μ M) en la presencia o ausencia de un exceso molar 2:1 de Nb80 durante 1h a RT. Las muestras se mezclaron luego con el fluoróforo CPM y se incubaron durante 2 min a temperaturas que varían de 10°C a 94°C y se recogió la emisión de fluorescencia. Se realizaron experimentos por triplicado y resultaron en curvas de fusión parecidas a los perfiles de estabilidad obtenidos para el GPCR APJ (Alexandrov et al., 2008). Pudieron describirse transiciones de despliegue mediante un modelo simple de dos estados, incluidos el estado nativo (plegado) y el desnaturalizado, que representan las mesetas inferiores y superiores de las curvas de fusión. La comparación de la curva de fusión del receptor unido a agonista con la curva de fusión del receptor unido a agonista en complejo con Nb80 indica que el nanocuerpo estabiliza la conformación activa del β_2 AR aumentando 12°C la temperatura de fusión (T_m) del receptor unido a agonista.

[0206] También analizamos el efecto del Nb80 sobre la agregación y el despliegue térmico del receptor unido a agonista por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Para este experimento, el receptor solubilizado con dodecilmaltósido se preincubó con isoproterenol (10 μ M) en presencia o ausencia de un exceso molar 2:1 de Nb80 durante 45 minutos a RT. A continuación, se incubaron las muestras durante 10 minutos a temperaturas en aumento y se analizaron subsecuentemente por SEC (Fig. 14). La comparación de los diferentes cromatogramas indica que el Nb80 protege el receptor unido a agonista contra la agregación inducida por temperatura.

Dominios de unión a proteínas que estabilizan estados conformacionales funcionales del receptor de angiotensina II de tipo 1a de rata (AT1aR)

Ejemplo 16. Inmunización, construcción de biblioteca y cribado inicial

[0207] Para obtener nanocuerpos madurados *in vivo* contra el AT1aR de rata, dos llamas (*Llama glama*) fueron inmunizadas con una fusión de AT1aR-lisozima T4 (T4L) recombinante truncada después de la Lys318 para excluir una respuesta inmunitaria al carboxilo terminal. El AT1aR se expresó en células de insecto (Shluka et al. 2006) y el antígeno se reconstituyó en vesículas lipídicas tal y como se ha descrito anteriormente (Day et al, 2007). Una llama fue inmunizada con receptor unido a angiotensina (agonista no sesgado), una llama fue inmunizada con el (ligando sesgado de β -arrestina TRV023 (Violin et al. 2010) unido al receptor. Después de seis administraciones semanales del receptor unido a agonista truncado reconstituido, se aislaron linfocitos de la sangre de la llama inmunizada y se preparó y cribó una biblioteca de fagos como se describe en Materiales y métodos para los ejemplos. Los ELISA en fase sólida identificaron nanocuerpos que reconocen el receptor AT1a.

10 Ejemplo 17. Selección de nanocuerpos específicos conformacionales mediante ELISA

[0208] En un primer cribado comparamos la unión de los nanocuerpos purificados en el antígeno de AT1aR de rata nativo y desnaturalizado por calor en un ELISA. Para cada nanocuerpo, un pocillo se recubre con el receptor. A continuación, esta placa se incubaba a 80°C durante 2 h. A continuación, otro pocillo vacío de la misma placa se recubre con el receptor sin calentar. Los nanocuerpos que son capaces de unirse selectivamente al receptor nativo pero no al receptor inactivado por calor reconocen epítomos conformacionales.

Ejemplo 18. Selección de nanocuerpos específicos de estado conformacional por transferencia puntual

[0209] En un cribado posterior comparamos la unión de aquellos nanocuerpos que se unen a epítomos conformacionales de un receptor AT1aR unido a agonista frente a un receptor unido a antagonista por análisis de transferencia puntual. Este cribado identifica nanocuerpos que reconocen selectivamente una conformación de un receptor unido a agonista (estado activo) frente a uno unido a antagonista (estado inactivo).

Ejemplo 19. Cribado para nanocuerpos de AT1aR que estabilizan selectivamente una conformación activa del receptor.

[0210] Además del ensayo de unión para especificidad de AT1aR (ELISA), los nanocuerpos purificados se evalúan en un experimento de competencia de radioligandos similar a los ensayos de radioligandos descritos en los ejemplos 6, 12 y 13. Se considera que los nanocuerpos que aumentan la afinidad del AT1aR por un agonista estabilizan una conformación activa del receptor.

Dominios de unión a proteínas que estabilizan estados conformacionales funcionales del receptor muscarínico de rata M3

Ejemplo 20. Inmunización, construcción de biblioteca y cribado inicial.

[0211] Para obtener nanocuerpos madurados *in vivo* contra el M3R de rata, una llama (*Llama glama*) fue inmunizada con una fusión de M3R-lisozima T4 (M3R-T4L) recombinante truncada en ambos sitios N y C-terminales para excluir una respuesta inmunitaria a los extremos. En la M3R-T4L el 3r bucle intracelular se sustituyó por lisozima T4. La M3R-T4L se expresó en células de insecto y el antígeno se reconstituyó tal y como se ha descrito anteriormente (Day et al, 2007). Después de seis administraciones semanales del receptor unido a antagonista (tiotropio) reconstituido, se aislaron linfocitos de la sangre de la llama inmunizada y se preparó y se cribó una biblioteca de fagos como se describe en Materiales y métodos para los ejemplos.

Ejemplo 21. Selección de nanocuerpos específicos conformacionales mediante ELISA

[0212] En un primer cribado comparamos la unión de los nanocuerpos purificados sobre el antígeno de M3R de rata nativo y desnaturalizado por calor en un ELISA. Para cada nanocuerpo, un pocillo se recubre con el receptor. A continuación, esta placa se incubaba a 80°C durante 2 h. A continuación, otro pocillo vacío de la misma placa se recubre con el receptor sin calentar. Los nanocuerpos que son capaces de unirse selectivamente al receptor nativo pero no al receptor inactivado por calor reconocen epítomos conformacionales.

Ejemplo 22. Selección de nanocuerpos específicos de estado conformacional por transferencia puntual

[0213] En un cribado posterior comparamos la unión de aquellos nanocuerpos que se unen a epítomos conformacionales de un receptor M3 unido a agonista frente a un receptor unido a antagonista por análisis de

transferencia puntual. Este cribado identifica nanocuerpos que reconocen selectivamente una conformación de un receptor unido a agonista (estado activo) frente a uno unido a antagonista (estado inactivo).

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

- 5 [0214] Además del ensayo de unión para especificidad de M3R (ELISA), nanocuerpos purificados se evalúan en un experimento de competencia de radioligandos similar a los ensayos de radioligandos descritos en los ejemplos 6, 12 y 13. Se considera que los nanocuerpos que aumentan la afinidad del M3R por un agonista estabilizan una conformación activa del receptor.

Materiales y métodos para los ejemplos

10 *Preparación de β_2 AR*

- [0215] El β_2 AR truncado después del aminoácido 365 (β_2 AR-365) con un marcador de epítipo Flag aminoterminal se expresó en células de insecto Sf9 y se purificó por cromatografía de afinidad secuencial de anticuerpo M1 y alprenolol tal y como se ha descrito anteriormente (Kobilka 1995). Se inmovilizó el β_2 AR-365 purificado en una columna Flag (Sigma) y se equilibró con 10 volúmenes de columna de una mezcla de 5 mg/ml de DOPC (Avanti Polar Lipids) y 0,5 mg/ml de lípido A (Sigma) en octilglucósido al 1% (p/v) (Anatrace), 100 mM de NaCl, 20 mM de Hepes pH 7,5, 2 mM de CaCl_2 y 1 μM de agonista (por ejemplo, isoproterenol). El β_2 AR se eluyó luego en el mismo tampón que con EDTA. La concentración del β_2 AR eluido se ajustó a 5 mg/ml. Esto normalmente implicaba diluir la proteína con el mismo tampón, pero ocasionalmente requería concentrar la proteína hasta dos veces con una célula de ultrafiltración de Amicon (poro de 100 kDa). La proteína se dializó luego contra solución salina tamponada con fosfato con 1 μM de agonista a 4°C para eliminar el detergente. La proteína reconstituida se almacenó a -80°C antes del uso para la inmunización.

Preparación de AT1aR

- [0216] El AT1aR con fusión de lisozima T4 en el tercer bucle se truncó después del aminoácido 318 (AT1aR-318). Esta construcción tiene un marcador de epítipo Flag aminoterminal y un marcador C-terminal de 10 histidinas. El AT1aR-318 se expresó en células de insecto Tni y se solubilizó en 20 mM de Hepes, pH 7,4, 1M de NaCl y MNG al 0,5% durante 2h a temperatura ambiente. El receptor se purificó por cromatografía de afinidad secuencial de Ni-NTA y anticuerpo M1-FLAG. El AT1aR purificado se reconstituyó en una mezcla de 5 mg/ml de DOPC (Avanti Polar Lipids) y 0,5 mg/ml de lípido A (Sigma) en octilglucósido al 1% (p/v) (Anatrace), 100 mM de NaCl, 20 mM de Hepes pH 7,5 y 100 μM de agonista (por ejemplo, angiotensina II). La concentración del AT1aR eluido se ajustó a 1-2 mg/ml. La proteína se dializó luego contra solución salina tamponada con fosfato con 100 μM de agonista a 4°C para eliminar el detergente. La proteína reconstituida se almacenó a -80°C antes del uso para la inmunización.

Preparación de receptor M3

- [0217] Se expresó el receptor muscarínico M3 con un marcador de epítipo Flag amino terminal y un marcador de hexahistidina carboxiloterminal en células de insecto Sf9 en presencia de 1 μM atropina (Vasudevan et al. 1995). El receptor tenía o el bucle 3 intracelular eliminado (M3R Δ i3) o sustituido con lisozima T4 (M3R-T4L). Las células se centrifugaron y luego se lisaron por choque osmótico, y la proteína se solubilizó en dodecilmaltósido al 1%, semisuccinato de colesterol al 0,1%, 750 mM de cloruro sódico, 20 mM de Hepes pH 7,5. El receptor solubilizado se purificó luego por cromatografía de afinidad de níquel seguida de cromatografía de afinidad de FLAG. La proteína purificada se separó luego por cromatografía de exclusión por tamaño para seleccionar el receptor monomérico, que se reconstituyó como se describe (Day et al, 2007).

Selección de nanocuerpos contra β_2 AR

- [0218] Una única llama recibió seis administraciones semanales del β_2 AR truncado reconstituido. Se aislaron linfocitos de la sangre de la llama inmunizada y se preparó el ARN total de estas células. Las secuencias codificantes del repertorio de nanocuerpos se amplificaron mediante una RT-PCR y se clonaron en el vector de expresión en fagos pMES4 (genbank GQ907248) (Conrath et al. 2001). Los fagos específicos de β_2 AR se enriquecieron por selección *in vitro* en placas de 96 pocillos Maxisorp (NUNC) recubiertas con el receptor reconstituido β_2 AR-365. Los fagos unidos a antígenos fueron recuperados de pocillos recubiertos de antígeno o con trietilamina pH11 y neutralizados con Tris-HCl pH 7 o mediante la adición de células de *E. coli* TG1 recién cultivadas. Después de dos rondas de *biopanning*, 96 colonias individuales se escogieron de forma aleatoria y los nanocuerpos se produjeron como una proteína soluble marcada con His en el periplasma de las células TG1. Los ELISA en fase

sólida identificaron 16 nanocuerpos conformacionales diferentes que reconocen el β_2 AR-365 unido a agonista nativo, pero no el receptor desnaturalizado por calor.

Selección de nanocuerpos contra AT1aR

[0219] Una única llama recibió seis administraciones semanales del AT1aR-318 reconstituido unido a su agonista angiotensina. Otra llama única recibió seis administraciones semanales de AT1aR-318 unido a un agonista sesgado TRV023. Después de la inmunización, los linfocitos de cada llama se aislaron por separado de la sangre. El ARN total se preparó a partir de estas células. De cada muestra se amplificaron las secuencias codificantes del repertorio de nanocuerpos por RT-PCR y se clonaron por separado (Conrath et al. 2001) en el vector de expresión en fagos pMESy4-vector para generar dos bibliotecas independientes. El pMESy4 es un derivado de pMES4 (genbank GQ907248) que lleva un marcador His₆ C-terminal seguido de los aminoácidos EPEA (De Genst et al. 2010). J.Mol. Biol 402: 326-343.

[0220] El fago específico de AT1aR fue enriquecido por selección *in vitro* en placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) recubiertas con el receptor AT1aR truncado reconstituido (una variante del receptor recombinante sin la inserción de T4L) unido a angiotensina o a TRV023, respectivamente. El fago unido a antígeno se recuperó de pocillos recubiertos con antígeno por digestión con tripsina. Después de dos rondas de *biopanning*, 92 colonias individuales (46 en AT1aR-angiotensina y 46 en AT1aR-TRV023) se escogieron de forma aleatoria y los nanocuerpos se produjeron como una proteína soluble marcada con His₆-EPEA en el periplasma de las células TG1.

Selección de nanocuerpos contra M3R

[0221] Una única llama recibió seis administraciones semanales de M3R-T4L truncado reconstituido unido al antagonista tiotropio. Después de la inmunización, los linfocitos de esta llama se aislaron de la sangre y el ARN total se preparó a partir de estas células. Las secuencias codificantes del repertorio de nanocuerpos se amplificaron por RT-PCR y se clonaron (Conrath et al. 2001) en el vector de expresión en fagos pMESy4-vector.

[0222] Para enriquecer en fagos específicos de M3R se siguieron diferentes estrategias de selección *in vitro* usando diferentes formatos del antígeno en presencia del agonista carbacol o el antagonista benzilato de quinuclidinilo (QNB). Los formatos de antígeno incluyen partículas similares a virus (VLP) que llevan el receptor de rata M3R Δ i3 (es decir, el receptor M3 con una delección en el 3^{er} bucle intracelular), membranas de células CHO humanas que contienen M3R (Perkin Elmer), M3R-T4L reconstituida recombinante o M3R Δ i3 reconstituido recombinante. Opcionalmente, las VLP que llevan el receptor de rata M3R Δ i3 o las membranas de M3R humano se capturaron por aglutinina de germen de trigo recubierta en placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc). El fago unido a antígeno se recuperó de los pocillos recubiertos con antígeno mediante una digestión con tripsina. Alternativamente, el fago seleccionado en el antígeno unido a agonista se eluye usando un exceso de antagonista o viceversa.

[0223] Después de dos rondas de *biopanning*, 180 colonias se escogieron de forma aleatoria y los nanocuerpos se produjeron como una proteína soluble marcada con His-EPEA en el periplasma de las células TG1. Un ELISA en fase sólida comparativo en receptor M3R-T4L frente a receptor AT1aR-T4L resultó en 66 nanocuerpos específicos de M3R.

Purificación de nanocuerpos para la caracterización bioquímica

[0224] Los nanocuerpos marcados con His o marcados con His-EPEA se expresaron en células de *E. coli* WK6. Los extractos periplásmicos se sometieron a cromatografía de afinidad por metales inmovilizados en sefarsa Fast Flow de sulfato de níquel (II) (GE Healthcare). Las fracciones de proteína de la IMAC se dializaron durante toda la noche en 100 mM de MES pH 6,5, 100 mM de tampón de NaCl. Los nanocuerpos dializados se purificaron además por cromatografía de intercambio de cationes (columna ÄKTA FPLC con Mono S 10/100 GL).

Cromatografía de exclusión por tamaño

[0225] Los nanocuerpos selectivos de agonista se identificaron por cromatografía de exclusión por tamaño tras la incubación de 20 μ M de β_2 AR-365N unido a agonista o agonista inverso (carazolol) durante 1h a RT en ausencia o presencia de 40 μ M de nanocuerpos. La cromatografía se realizó en DDM al 0,1 %, 20 mM de Hepes pH 7,5, 100 mM de NaCl en presencia de 1 μ M de los respectivos ligandos usando una columna ÄKTA FPLC con Superdex 200 10/300 GL.

Unión de ligando en el receptor β_2 AR truncado en preparaciones de membrana de células de insecto.

[0226] Se realizaron experimentos de unión de competencia sobre β_2 AR-365 expresado en membranas de células de insecto Sf9 en ausencia o presencia de 1 μ M de nanocuerpo durante 90 min a RT en tampón de unión (75 mM de Tris pH 7,5, 12,5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de EDTA, BSA al 0,05% y 10 μ M de GTPyS) con 0,5 nM de [3H]-dihidroalprenolol y (-)-isoproterenol en concentraciones que varían de 10^{-11} M a 10^{-4} M. El radioligando unido se separó del no unido sobre filtros Whatman GF/B usando una cosechadora Brandel. Los datos son la media $\pm$ S.E. de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

Fluorescencia del bimano.

[0227] El β_2 AR purificado se hizo reaccionar con equivalente de monobromobimano (mBBBr, Invitrogen) 1:1 en 100 mM de NaCl, 20 mM de Hepes, pH 7,5, maltósido de dodecilo al 0,1% y se incubó durante toda la noche en hielo en la oscuridad. El receptor marcado con fluoróforo se purificó justo antes de usar mediante filtración en gel en una columna de desalación equilibrada con el mismo tampón. Los experimentos de espectroscopia de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro Spex FluoroMax-3 (Jobin Yvon Inc, NJ) con modo de recuento de fotones usando un paso de banda de excitación y emisión de 4 nm. Todos los experimentos se realizaron a 25°C. Para los escaneos de emisión, la excitación se estableció a 370 nm y la emisión se midió desde 430-530 nm con un tiempo de integración de 1 s/nm. Para determinar el efecto de los nanocuerpos y los ligandos, tres muestras de proteína marcada individuales se incubaron con 1 μ M de nanocuerpo o 10 μ M de isoproterenol o ambos. Los espectros de emisión de las muestras se tomaron después de 1 hora de incubación. La intensidad de fluorescencia se corrigió para la fluorescencia de fondo del tampón y los ligandos en todos los experimentos. Los datos son la media $\pm$ S.E. de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

Preparación de β_2 AR-T4L y nanocuerpo-80 para cristalografía

[0228] El β_2 AR-T4L se expresó en cultivos de células de insecto Sf-9 infectadas con baculovirus β_2 AR-T4L y se solubilizó según métodos previamente descritos (Kobilka 1995). La proteína funcional se obtuvo por cromatografía de afinidad de M1 FLAG (Sigma) antes y después de la cromatografía de alprenolol-sefarosa (Kobilka 1995). En el segundo paso de la cromatografía M1, el alprenolol unido a receptor se cambió por un agonista de alta afinidad y el dodecilmaltósido se cambió por el MNG-3 anfifílico para una estabilidad del receptor aumentada (Chae y Gellman, no publicado). El β_2 ART4L unido a agonista y con el detergente cambiado se eluyó en 10 mM de Hepes pH 7,5, 100 mM de NaCl, MNG-3 al 0,02% y 10 μ M de agonista seguido de la eliminación de la N-glicosilación por tratamiento con PNGaseF (NEB). La proteína se concentró a $\sim$ 50 mg/ml con un concentrador Vivaspinn (Vivascience) con un corte de peso molecular de 100 kDa.

[0229] El nanocuerpo 80 (Nb80) que lleva un marcador His₆ C-terminal se expresó en el periplasma de la cepa de *E. coli* WK6 tras la inducción con IPTG. Se cultivaron cultivos de 0,6 L a $OD_{600} = 0,7$ a 37°C en medio TB con glucosa al 0,1%, 2 mM de $MgCl_2$ y 50 μ g/ml de ampicilina. Los cultivos inducidos se cultivaron durante toda la noche a 28°C. Las células se cosecharon por centrifugación y se lisaron en el tampón helado (50 mM de Tris pH 8,0, 12,5 mM de EDTA, y 0,125 M de sacarosa), luego se centrifugaron para eliminar restos celulares. El Nb80 se purificó por cromatografía de afinidad de níquel, se dializó contra tampón (10 mM de Hepes pH 7,5, 100 mM de NaCl) y se concentró por centrifugación a $\sim$ 120 mg/ml.

Cristalización

[0230] El β_2 AR-T4L unido a agonista y el nanocuerpo (por ejemplo, Nb80) se mezclaron con una proporción molar 1:1,2, se incubaron 2 horas a RT antes de mezclarse con monooleína licuada (M7765, Sigma) con colesterol al 10% (C8667, Sigma) con una proporción proteína a lípido 1:1,5 (p/p) usando el método de mezclado de doble jeringa desarrollado por Martin Caffrey (Caffrey y Cherezov 2009). Se identificaron cabezas de serie de cristalización iniciales usando cribados internos y se optimizaron en placas de sándwich de vidrio de 24 pocillos usando gotas de 50 nl de proteína:lípido administradas manualmente y cubiertas con 0,8 μ l de solución precipitante en cada pocillo y selladas con un cubreobjetos de vidrio. Se cultivaron cristales para la colección de datos a 20°C por difusión de vapor de gota pendiente usando 0,8 μ l de solución de almacenamiento (del 36 al 44% de PEG 400, 100 mM de Tris pH 8, DMSO al 0,4 %, 1,2,3-heptanotriol al 1 %) diluido de 2 a 4 veces en agua Milli-Q. Los cristales crecieron a tamaño completo en un plazo de 7 a 10 días. Los cristales se congelaron de manera instantánea y se almacenaron en nitrógeno líquido con la solución de almacenamiento como crioprotector.

Colección y procesamiento de datos de microcristalografía

[0231] Los datos de difracción se midieron en la línea del haz 23-ID del Advanced Photon Source, usando un haz de 10 μ m de diámetro. Se utilizaron imágenes de dosis baja de rotación de 1,0° para localizar y centrar cristales para la colección de datos. Se midieron los datos en imágenes de 1,0° con tiempos de exposición típicamente de

5-10 s con un rayo atenuado 5x. Solo datos de 5-10° pudieron medirse antes de que ocurrieran daños significativos por radiación. Los datos se integraron y se estandarizaron con el paquete HKL2000 (Otwinowski 1997).

Solución y refinamiento de la estructura

[0232] Se obtuvieron fases de sustitución molecular con el programa Phaser (McCoy 2007). Los modelos de búsqueda fueron 1) la estructura del β_2 AR unido a carazolol de alta resolución, PDB id 2RH1, pero con T4L y todas las moléculas de agua, ligando y lípido eliminadas) y un nanocuerpo (PDB id 3DWT, moléculas de agua eliminadas) como modelos de búsqueda. Las puntuaciones Z de la función de rotación y traslación fueron 8,7 y 9,0 después de la colocación del modelo de β_2 AR, y el modelo de nanocuerpo colocado posteriormente tenía unas puntuaciones Z de la función de rotación y traslación de 3,5 y 11,5. El modelo se refinó en Phenix (Afonine 2005) y Buster (Blanc 2004), usando un modelo de factor del grupo B con una B para la cadena principal y una B para los átomos de la cadena lateral. Las estadísticas de refinamiento se dan en la tabla 5. A pesar de la fuerte anisotropía (tabla 5), la densidad electrónica estaba clara para la colocación de las cadenas laterales.

Unión de ligando en el receptor β_2 AR truncado reconstituido en partículas HDL.

[0233] El efecto del Nb80 y G_s sobre la afinidad de los receptores por agonistas se comparó en los experimentos de unión de competencia. El β_2 AR y el β_2 AR-T4L (ambos truncados en la posición 365) purificados tal y como se ha descrito anteriormente (Rosenbaum et al. 2007; Rasmussen et al. 2007) fueron reconstituidos en partículas de lipoproteína de alta densidad (HDL) seguido de la reconstitución de la G_s en partículas HDL que contenían β_2 AR según métodos previamente publicados (Whorton et al. 2007). Se usaron 0,6 nM de [3 H]-dihidroalprenolol (3 H-DHA) como radioligando y (-)-isoproterenol (ISO) en concentraciones que varían de 10^{-12} a 10^{-4} M como competidor. El Nb80 se usó a 1 μ M. GTP γ S se usó a 10 μ M. TBS (50 mM de Tris pH 7,4, 150 mM de NaCl) con BSA al 0,1% se usó como tampón de unión. El 3 H-DHA unido se separó del no unido en una cosechadora Brandel pasando sobre un filtro Whatman GF/B (previamente empapado en TBS con polietilimina al 0,3%) y se lavó en TBS frío. La unión de radioligandos se midió en un contador de centelleo Beckman LS6000. La afinidad de unión de ligando (K_d) del DHA se determinó a partir de las curvas de unión de saturación usando el *software* GraphPad Prism. Las afinidades de unión del ISO (valores K_i , tabulados en la tabla 4) se determinaron a partir de los valores IC_{50} usando la ecuación $K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d)$.

Unión de ligando en el receptor β_2 AR en toda su longitud en extractos de membrana de células de insecto para la identificación de agonistas mejorada.

[0234] Los experimentos de unión de radioligandos de competencia en extractos de membrana se realizaron esencialmente como describen Seifert y sus compañeros (Seifert et al. 1998. Eur. J. Biochem. 255: 369-382). Diez μ g de extractos de membrana homogeneizados de células de insecto que contenían β_2 AR humano (Perkin Elmer, n.º de cat. 6110106400UA) se incubaron con Nb80 o un nanocuerpo no relacionado (control negativo; Irr Nb) durante 1h a 37°C en el tampón de incubación (75 mM de Tris-HCl, 12,5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de EDTA y BSA al 0,2% p/v) en placas de 24 pocillos (Corning Costar). Los nanocuerpos se aplicaron a una concentración final de 500 nM, que corresponde a un exceso de 3000 veces de nanocuerpo frente al receptor adrenérgico. Posteriormente, una serie de dilución apropiada del ligando bajo investigación se añadió a los extractos de membrana unida a nanocuerpo junto con 2 nM de radioligando 3 H-DHA (Perkin Elmer n.º de cat. NET720001MC; actividad específica de 104,4 Ci/mmol). El volumen total por pocillo se ajustó con tampón de incubación a 500 μ l y la mezcla reactiva se incubó adicionalmente durante otra hora a 37°C al baño maría. Después de la cosecha de los extractos de membrana con una cosechadora celular (Inotech) sobre filtros de fibra de vidrio (papel de filtro Whatmann GF/B), los filtros se lavaron con tampón de lavado helado (50 mM de Tris-HCl pH 7,4) y partes de los filtros secados al aire se transfirieron a tubos de centelleo que contenían 3,5 ml de líquido de centelleo Optiphase 'Hisafe 2' (Perkin Elmer). La radiactividad se midió en un contador de centelleo LKB Wallace después de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente.

Cribado de biblioteca de compuestos.

[0235] Una biblioteca de compuestos se cribó para agonistas usando un ensayo de unión de radioligandos de competencia. Para este fin, 10 μ g de extractos de membrana preparados internamente a partir de células HEK293T que expresan β_2 AR humano (nivel de expresión de ~ 10 pmol/mg de proteína de membrana) se preincubaron con Nb80 o un nanocuerpo no relacionado (control negativo) durante 1h a 30°C en tampón de incubación (50 mM de Hepes pH 7,4, 1 mM de $CaCl_2$, 5 mM de $MgCl_2$, 100 mM de NaCl y BSA al 0,5% p/v). Los nanocuerpos se aplican a una concentración final de 500 nM, que corresponde aproximadamente a un exceso de 3000 veces de nanocuerpo frente al β_2 AR. Posteriormente, las membranas cargadas de nanocuerpos se añaden a placas de 96 pocillos que contienen compuestos de bibliotecas y 2 nM del radioligando 3 H-dihidroalprenolol (DHA). El volumen total por pocillo se ajusta con tampón de incubación a 100 μ l y la mezcla reactiva se incubaba posteriormente durante otra hora a 30°C. Posteriormente, el radioligando unido a la membrana se cosecha usando una placa de filtro de 96 pocillos de

fibra de vidrio GF/B (Perkin Elmer) previamente empapada en polietilenimina al 0,3%. Las placas de filtro se lavan con tampón de lavado helado (50 mM de Tris-HCl pH 7,4) y se secan durante 30 minutos a 50°C. Después de añadir 25 µl de fluido de centelleo (MicroScint™-O, Perkin Elmer), se mide la radiactividad (cpm) en un contador de centelleo Wallac MicroBeta TriLux.

5 *Espectroscopia de fluorescencia del bimano en β_2 AR reconstituido en partículas HDL.*

[0236] Para comparar los efectos sobre la conformación del receptor de la unión de G_s y Nb80, el β_2 AR purificado se marcó con la sonda fluorescente sensible al entorno monobromo-bimano (Invitrogen) con la cisteína 265 situada en el extremo citoplásmico del TM6 y se reconstituyó en partículas HDL (mBB- β_2 AR/HDL). Antes de obtener los espectros de emisión de fluorescencia, 10 nM de mBB- β_2 AR/HDL se incubaron 30 min a RT en tampón (20 mM de Hepes pH 7,5, 100 mM de NaCl) en ausencia o presencia de 10 µM de ISO, 1 µM del agonista inverso ICI-118,551 (ICI), 300 nM de heterotrímero de G_s o 300 nM de Nb80, o en combinaciones de ISO con G_s , ISO con Nb80 e ICI con Nb80. La espectroscopia de fluorescencia se realizó en un espectrofluorímetro Spex FluoroMax-3 (Jobin Yvon Inc.) con el modo de recuento de fotones, usando un paso de banda de excitación y emisión de 5 nm. La excitación se estableció a 370 nm y la emisión se recogió de 415 a 535 nm en incrementos de 1 nm con un tiempo de integración de 0,3 s/nm. La intensidad de fluorescencia se corrigió para la fluorescencia de fondo del tampón y los ligandos.

Tabla 1. Lista de nanocuerpos específicos de β_2 AR

Número de referencia de los nanocuerpos	Anotación breve de los nanocuerpos	SEQ ID NO
CA2764	NB64	1
CA3431	NB31	2
CA3413	NB13	3
CA2780	NB80	4
CA2765	NB65	5
CA2761	NB61	6
CA3475	NB75	7
CA2770	NB70	8
CA3472	NB72	9
CA3420	NB20	10
CA3433	NB33	11
CA3434	NB34	12
CA3484	NB84	13
CA2760	NB60	14
CA2773	NB73	15
CA3477	NB77	16
CA2774	NB74	17
CA2768	NB68	18
CA3424	NB24	19
CA2767	NB67	20
CA2786	NB86	21
CA3422	NB22	22
CA2763	NB63	23
CA2772	NB72	24
CA2771	NB71	25
CA2769	NB69	26

CA2782	NB82	27
CA2783	NB83	28
CA2784	NB84	29

Tabla 2. CDR de nanocuerpos específicos de β_2 AR

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

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

TABLA 3. Propiedades de unión de agonista completo de membranas que expresan β_2 AR en presencia y ausencia de nanocuerpos.

La unión de competencia de [3 H]-DHA se realizó en membranas de células de insecto Sf9 que expresan β_2 AR, en presencia o ausencia de 1 μ M de nanocuerpos. Los datos representan la media $\pm$ s.e. de dos experimentos independientes realizados por triplicado. Los valores IC₅₀ usados para cálculos de valores K_i se obtuvieron a partir de medias de valores pIC₅₀ determinados por análisis de regresión no lineal usando Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) y el intervalo de s.e. a partir de pIC₅₀ $\pm$ s.e.

Isoproterenol K _i [intervalo de S.E.] (nm)	
β_2 AR	295 [211-412]
+ NB65	13,8 [6,98 - 27,3]
+ NB67	19,4 [11,3 - 33,1]
+ NB69	53,5 [34,3 - 83,1]
+ NB71	10,6 [3,68 - 30,4]
+ NB72	145 [93,3 - 226]
+ NB80	10,0 [4,74 - 210]
+ NB84	75,4 [35,9 - 158]

TABLA 4. Caracterización farmacológica de β_2 AR reconstituido en partículas HDL en complejo con Gs y Nb80

Unión de saturación de [3 H]-DHA K _d $\pm$ S.E.	Unión de competencia [3 H]-DHA / (-)-isoproterenol K _i del estado de baja afinidad [Intervalo de S.E.]	K _i del estado de alta afinidad [intervalo de S.E.]
---	---	--

	nM	nM	nM	
β_2 AR	$0,55 \pm 0,09$ (n=3)	107,5 [103,8 - 111,3]		(n=3)
β_2 AR + G_s		95,3 [82,8 - 109,7]	1,07 [0,96-1,19]	(n=4)
β_2 AR + G_s + GTP γ S		95,2 [92,2 - 98,3]		(n=3)
β_2 AR + NB80			1,13 [1,09 - 1,18]	(n=3)
β_2 AR-T4L	$0,42 \pm 0,01$ (n=3)	33,5 [31,6-35,5]		(n=3)
β_2 AR-T4L + NB80			0,56 [0,54 - 0,57]	(n=4)

TABLE 5. Colección de datos de rayos X y estadísticas de refinamiento del complejo β_2 AR-Nb80

A. Estadísticas de colección de datos

longitud de onda (Å)	1,0332
grupo espacial	C2
parámetros de la célula unitaria	
a (Å)	236,7
b (Å)	45,7
c (Å)	71,4
β (°)	102,3
número de cristales	23
resolución (Å)	37-3,50 (3,56-3,50)
reflexiones únicas	10147 (903)
completitud	94,8 (93,7)
multiplicidad	3,5(3,2)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	6,7 (1,8)
$R_{\text{combinación}}$ (%)	0,192 (0,594)

B. estadísticas de refinamiento

resolución (Å)	37-3,50
Nº de reflexiones conjunto de trabajo (conjunto de prueba)	9210 (937)
$R_{\text{trabajo}}/R_{\text{libre}}$ (%)	0,225 / 0,294
rmsd de la idealidad	
longitudes de enlace (Å)	0,010
ángulos de enlace (°)	1,3
Corrección anisotrópica B (Å ²)	$B_{11}=33,5/B_{22}=2,7/B_{33}=-36,3/B_{13}=4,5$
Factor B medio (Å ²)	
receptor	76,4
nanocuerpo	96,6
agonista	62,4
Análisis de Ramachandran	
residuos en la región más favorecida (%)	86,6
región permitida adicionalmente (%)	13,4
región permitida generosamente (%)	0,0
región no permitida (%)	0,0

TABLA 6. El nanocuerpo 80 indujo el desplazamiento de potencia de los (ant)agonistas. Los agonistas muestran una afinidad aumentada por el complejo β_2AR-Nb80.		
ID del competidor	Tipo de competidor para β_2AR	Desplazamiento de potencia*
isoproterenol	agonista	8,8
alprenolol	antagonista	1,1
carvedilol	antagonista	1,2
CGP12177A	antagonista	1,0
salmeterol	agonista completo	3,3
terbutalina	agonista parcial	4,3
dobutamina	agonista parcial	2,3
salbutamol	agonista parcial	4,2
ICI118,551	Agonista inverso	0,9
metaproterenol	agonista	2,9
procaterol	agonista	2,3
ritodrina	agonista	2,7
fenoterol	Agonista completo	3,7
formoterol	agonista	4,0
timolol	antagonista	0,6
*Los desplazamientos de potencia se determinaron como la proporción del CI_{50} medido en presencia de un Nb irrelevante (control negativo) y el CI_{50} medido en presencia de Nb80.		

[0237]

- Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., y Adams, P. D. (2005). A robust bulk-solvent correction and anisotropic scaling procedure. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 61, 850-5.
- 5 Ahuja, S. y Smith, S. O. Multiple switches in G protein-coupled receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* 30, 494-502, doi:S0165-6147(09)00124-2 [pii] 10.1016/j.tips.2009.06.003 (2009).
- Alexandrov, A. I., M. Mileni, et al. (2008). Microscale Fluorescent Thermal Stability Assay for Membrane Proteins. *Structure* 16: 351-359.
- 10 Altenbach, C., Kusnetzow, A. K., Ernst, O. P., Hofmann, K. P. y Hubbell, W. L. High-resolution distance mapping in rhodopsin reveals the pattern of helix movement due to activation. *Proc Natl Acad Sci U SA* 105, 7439-7444, doi:0802515105 [pii] 10.1073/pnas.0802515105 (2008).
- Ballesteros, J. A. y Weinstein, H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein coupled receptors. *Meth. Neurosci.* 25, 366-428 (1995).
- 15 Ballesteros, J. A. et al. Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J Biol Chem* 276, 29171-29177. (2001).
- Blanc, E., Roversi, P., Vornrhein, C., Flensburg, C., Lea, S. M., Bricogne, G., et al. (2004). Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 60, 2210-21.
- 20 Binz et al., *Nature Biotech.*, 22: 575-582 (2004)
- Bokoch, M. P. et al. Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 463, 108-112, doi:nature08650 [pii] 10.1038/nature08650 (2010).
- Caffrey (2003). Membrane protein crystallization. *J Struct. Biol.* 2003 142:108-32.
- 25 Caffrey, M. y Cherezov, V. Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases. *Nat Protoc* 4, 706-731, doi:nprot.2009.31 [pii] 10.1038/nprot.2009.31 (2009).
- Chelikani et al. *Protein Sci.* 2006 15:1433-40
- Cherezov, V. et al. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318, 1258-1265, doi:1150577 [pii] 10.1126/science.1150577 (2007).
- 30 Chini, B., y Parenti, M. (2009). G-protein-coupled receptors, cholesterol and palmitoylation: facts about fats. *Journal of molecular endocrinology*, 42(5), 371-9.

- Chomczynski, P. y Sacchi, N., 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, p. 156.
- Conrath K. E., M. Lauwereys, M. Galleni et al., *Antimicrob Agents Chemother* 45 (10), 2807 (2001).
- Conrath K, Pereira AS, Martins CE, Timóteo CG, Tavares P, Spinelli S, Kinne J, Flaudrops C, Cambillau C, 5
Muyldermans S, Moura I, Moura JJ, Tegoni M, Desmyter A. Camelid nanobodies raised against an integral membrane enzyme, nitric oxide reductase. *Protein Sci.* 2009 Mar; 18(3): 619-28.
- Cooper M.A. (2004) *J. Mol. Recognit.* 17: 286-315.
- Day P.W., Rasmussen S.G., Parnot C., Fung J.J., Masood A., Kobilka T.S., Yao X.J., Choi H.J., Weis W.I. y 10
Rohrer D.K. et al., A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography, *Nat Methods* 4 (2007), págs. 927-929.
- De Genst et al. 2010). *J.Mol. Biol* 402: 326-343.
- Delean, A., J. M. Stadel, et al. (1980). "A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase coupled beta-adrenergic receptor." *J Biol Chem* 255(15): 7108-7117.
- Derewenda Z. S. Rational protein crystallization by mutational surface engineering, *Structure (Camb)* 12 15
(2004), págs. 529-535.
- Dimitrov DS. Engineered CH2 domains (nanobodies). *MAbs.* 2009 Jan-Feb; 1(1): 26-8.
- Eroglu et al. *EMBO* 2002 3: 491^96
- Eroglu et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003 100: 10219-10224
- Faham et al. Crystallization of bacteriorhodopsin from bicelle formulations at room temperature. *Protein Sci.* 20
2005 14: 836-40. 2005
- Faham et al, Bicelle crystallization: a new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure. *J Mol Biol.* 2002 Feb 8; 316(1): 1-6.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, et al. (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." *Molecular Pharmacology* 63(6): 25
1256-1272.
- Gebauer M, Skerra A. Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol.* 2009 Jun; 13(3): 245-55.
- George et al, *Nat Rev Drug Discov* 1: 808-820 (2002)
- Ghanouni et al. 2000
- Ghanouni, P. et al. Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling 30
domain of the beta 2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* 276, 24433-24436. (2001).
- Gouaux, It's not just a phase: crystallization and X-ray structure determination of bacteriorhodopsin in lipidic cubic phases. *Structure.* 1998 6: 5-10;
- Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans et al. Naturally occurring antibodies devoid of light 35
chains. *Nature* 363, 446-448, doi:10.1038/363446a0 (1993).
- Hanson, M. A. et al. A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 angstrom structure of the human beta(2)-adrenergic receptor. *Structure* 16, 897-905 (2008).
- Heilker et al. 2009. *Drug Discovery Today* 14: 231-240.
- Hendrickson WA. Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron 40
radiation. *Science.* 1991 Oct 4; 254(5028): 51-8.
- Hofmann K. P., P. Scheerer, P. W. Hildebrand et al., *Trends Biochem Sci* 34 (11), 540 (2009).
- Hunte C. y Michel H., Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments, *Curr Opin Struct Biol* 12 (2002), págs. 503-508.
- Jaakola, V. P. et al. The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A2A Adenosine Receptor Bound to an 45
Antagonist. *Science* (2008).
- Kallwass et al, *Biotechnol. Lett.*, 15 (1), 29-34, 1993
- Kenakin, *Trends Pharmacol Sci* 25:186-192 (2002)
- Kobilka B. K. y X. Deupi, *Trends in Pharmacological Sciences* 28 (8), 397 (2007).
- Kobilka, B. K. Amino and carboxyl terminal modifications to facilitate the production and purification of a G 50
protein-coupled receptor. *Anal Biochem* 231, 269-271 (1995).
- Koide et al, *J. Mol. Biol.*, 284: 1141-1151 (1998)
- Koide, S. (2009). Engineering of recombinant crystallization chaperones. *Current Opinion in Structural Biology*, 19, 449.
- Krissinel, E y Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* 55
372, 774-797
- Landau et al, Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996 93: 14532-5
- Lee, A. G. (2004). How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1666(1-2), 62-87.
- Lefranc MP, Duprat E, Kaas Q, Tranne M, Thiriot A, Lefranc G. IMGT unique numbering for MHC groove G- 60
DOMAIN and MHC superfamily (MhcSF) G-LIKE-DOMAIN. *Dev Comp Immunol.* 2005; 29(11): 917-38.
- Lefranc, M. P., C. Pommie, et al. (2003). "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains." *Developmental and Comparative Immunology* 27(1): 55-77.
- Li H., Dunn J.J., Luft B.J. y Lawson C.L., Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein A 65
complexed with an Fab, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), págs. 3584-3589

- Li, J., Edwards, P. C., Burghammer, M., Villa, C. y Schertler, G. F. Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form. *J Mol Biol* 343, 1409-1438 (2004).
- Liapakis, G. et al. The forgotten serine. A critical role for Ser-2035.42 in ligands binding to and activation of the beta 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 275, 37779-37788. (2000).
- 5 Luca et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003 100: 10706-11
- Lynch Kevin R. (Ed) Identification and Expression of G Protein-Coupled Receptors published by John Wiley y Sons (marzo de 1998)
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., Read, R. J., et al. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography*, 40(Pt 4), 658-674.
- 10 Magnani, F., Y. Shibata, et al. (2008). Co-evolving stability and conformational homogeneity of the human adenosine A2a receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(31): 10744-10749.
- Mansoor et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006 103: 3060-3065
- Marchese et al. *Genomics* 23: 609-618, 1994
- 15 Nakamichi, H. y Okada, T. Local peptide movement in the photoreaction intermediate of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12729-12734, doi:0601765103 [pii] 10.1073/pnas.0601765103 (2006).
- Neubig, R. R., M. Spedding, et al. (2003). "International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology." *Pharmacological reviews* 55(4): 597-606
- 20 Niu et al, *Biophys J.* 2005 89: 1833-1840
- Nollert et al. Lipidic cubic phases as matrices for membrane protein crystallization *Methods*. 2004 34: 348-53
- Nygren, P-A. (2008) Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. *FEBS J.* 275, 2668-2676.
- Ostermeier C., Iwata S., Ludwig B. y Michel H., Fv fragment-mediated crystallization of the membrane protein bacterial cytochrome c oxidase, *Nat Struct Biol* 2 (1995), págs. 842-846.
- 25 Otwinowski, Z., y Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in enzymology*, 276, 307-325.
- Palczewski, K. et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor [see comments]. *Science* 289, 739-745 (2000).
- 30 Park, J. H., Scheerer, P., Hofmann, K. P., Choe, H. W. y Ernst, O. P. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* 454, 183-U133 (2008).
- Parnot, C., Miserey-Lenkei, S., Bardin, S., Corvol, P. y Clauser, E. Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab* 13, 336-343 (2002).
- Pellissier, L. P. et al. Conformational toggle switches implicated in basal constitutive and agonist-induced activated states of 5-hydroxytryptamine-4 receptors. *Mol Pharmacol* 75, 982-990, doi:mol.108.053686 [pii] 10.1124/mol.108.053686 (2009).
- 35 Probst et al. 1992, *DNA Cell Biol.* 1992 11: 1-20;
- Qian ZM, Li H, Sun H y Ho K (2002). Targeted drug delivery via the transferring receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev* 54, 561-587.
- 40 Rasmussen S.G., Choi H.J., Rosenbaum D.M., Kobilka T.S., Thian F.S., Edwards P.C., Burghammer M., Ratnala V.R., Sanishvili R. y Fischetti R.F. et al., Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor, *Nature* 450 (2007), págs. 383-387.
- Rios et al., *Pharmacol Ther* 92: 71-87 (2001)).
- Ritter, S. L., y Hall, R. a. (2009). Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(12), 819-30. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nrm2803.)
- 45 Rosenbaum D. M., S. G. Rasmussen, y B. K. Kobilka, *Nature* 459 (7245), 356 (2009).
- Rosenbaum D. M., V. Cherezov, M. A. Hanson et al., *Science* 318 (5854), 1266 (2007).
- Rummel et al, *Lipidic Cubic Phases: New Matrices for the Three-Dimensional Crystallization of Membrane Proteins. J. Struct. Biol.* 1998 121: 82-91;
- 50 Sawant R, Torchilin V. Intracellular transduction using cell-penetrating peptides. *Mol Biosyst.* 2010 Apr; 6(4): 628-40. Epub 2009 Dec 21.
- Scheerer, P. et al. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* 455, 497_502 (2008).
- Schertler, G. F. Structure of rhodopsin and the metarhodopsin I photointermediate. *Curr Opin Struct Biol* 15, 408-415 (2005).
- 55 Shi, L. et al. Beta2 adrenergic receptor activation. Modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch. *J Biol Chem* 277, 40989-40996 (2002).
- Shimada et al. *J. Biol. Chem.* 2002 277: 31774-80
- Shukla AK, Reinhart C, Michel H. (2006) Comparative analysis of the human angiotensin II type 1a receptor heterologously produced in insect cells and mammalian cells *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 13; 349(1): 6-14.
- 60 Skerra, J. *Molecular Recognition*, 13: 167-187 (2000).
- Stanley, A. M. y K. G. Fleming. Process of folding proteins into membranes: Challenges and progress. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 469(1): 46-66 (2008)
- 65 Starovasnik MA, Braisted AC, Wells JA. Structural mimicry of a native protein by a minimized binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 Sep 16; 94(19): 10080-5.

- Steve Watson (Ed) G-Protein Linked Receptor Factsbook, published by Academic Press (1ª edición; 1994).
Strader, C. D. et al. Identification of residues required for ligand binding to the β_2 -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 4384-4388 (1987).
Tatsuya Haga (Ed), G Protein-Coupled Receptors, published by CRC Press (24 de septiembre de 1999)
- 5 Vasudevan, S., Hulme, E.C., Bach, M., Haase, W., Pavia, J., Reilander, H. (1995) *Eur. J. Biochem.* 227, 466-475.
- Warne, T. et al. Structure of a β_2 -adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454, 486-491, doi:nature07101 [pii] 10.1038/nature07101 (2008).
- 10 Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauert, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplin, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Boyer, O., Seman, M., Licea, A., Serreze, D.V., Goldbaum, F.A., Haag, F. y Koch-Nolte, F. (2009). Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol.* 198, 157-174.
- Wess Jürgen (Ed) Structure-Function Analysis of G Protein- Coupled Receptors published by Wiley-Liss (1ª edición; 15 de octubre de 1999)
- 15 Whorton, M. R. et al. A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7682-7687, doi:0611448104 [pii] 10.1073/pnas.0611448104 (2007).
- Wieland, K., Zuurmond, H. M., Krasel, C., Ijzerman, A. P. y Lohse, M. J. Involvement of Asn-293 in stereospecific agonist recognition and in activation of the β_2 -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9276-9281 (1996).
- 20 Yao, X. J. et al. The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9501-9506, doi:0811437106 [pii] 10.1073/pnas.0811437106 (2009).
- Yoshikawa T, Sugita T, Mukai Y, Abe Y, Nakagawa S, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y. The augmentation of intracellular delivery of peptide therapeutics by artificial protein transduction domains. *Biomaterials*. 2009 Jul; 30(19): 3318-23.
- 25 Violin JD, DeWire SM, Yamashita D, Rominger DH, Nguyen L, Schiller K, Whalen EJ, Gowen M, Lark MW. (2010) *J Pharmacol Exp Ther.* 335(3): 572-9.
- Zhang, X. J., Wozniak, J. A. y Matthews, B. W. Protein flexibility and adaptability seen in 25 crystal forms of T4 lysozyme. *J Mol Biol* 250, 527-552, doi:S0022-2836(85)70396-8 [pii] 10.1006/jmbi.1995.0396 (1995).
- 30 Zhou Y, Bowie JU (2000) Building a thermostable membrane protein. *J Biol Chem* 275: 6975-6979

LISTADO DE SECUENCIAS

[0238]

<110> VIB VZW VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY

35 <120> DOMINIOS DE UNIÓN A PROTEÍNAS QUE ESTABILIZAN ESTADOS CONFORMACIONALES FUNCIONALES DE LOS GPCR

<130> JST/GPCR/349

<150> US 61/399,781

<151> 16-07-2010

40 <150> GB1014715.5

<151> 06-09-2010

<160> 70

<170> versión de PatentIn 3.5

<210> 1

45 <211> 120

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 1

ES 2 771 479 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2
<211> 120
<212> PRT
<213> Lama glama

5

<400> 2

ES 2 771 479 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Lama glama

<400> 3

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

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

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

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

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

ES 2 771 479 T3

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

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

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<400> 5

ES 2 771 479 T3

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

<210> 6

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 6

ES 2 771 479 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

- 5 <210> 7
<211> 119
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 7

ES 2 771 479 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<400> 8

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

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

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

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

ES 2 771 479 T3

50

55

60

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

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

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

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> Lama glama

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

ES 2 771 479 T3

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

5 <400> 10

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Lama glama

10

<400> 11

ES 2 771 479 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

- 5 <210> 12
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Lama glama

<400> 12

ES 2 771 479 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<400> 13

ES 2 771 479 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

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

<400> 14

ES 2 771 479 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<400> 15

ES 2 771 479 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

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

<400> 16

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

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

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

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

ES 2 771 479 T3

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

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

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

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18

10 <211> 119

ES 2 771 479 T3

<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 18

```

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

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

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

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

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

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

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

      Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 19
<211> 115
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 19

10

ES 2 771 479 T3

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

- 5 <210> 20
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> Lama glama
- <400> 20

ES 2 771 479 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

5

<400> 21

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

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

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

ES 2 771 479 T3

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

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

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

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

Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<400> 22

ES 2 771 479 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23

<211> 114

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 24

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<400> 24

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

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

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

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

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

ES 2 771 479 T3

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

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

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

<210> 25
<211> 116
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 123
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 26

ES 2 771 479 T3

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

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

<400> 27

ES 2 771 479 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 28

ES 2 771 479 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<400> 29

ES 2 771 479 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 30

Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Thr
1 5

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

<400> 31

15 Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn Asp
1 5

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

<400> 32

Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Asp
1 5

<210> 33

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<400> 33

Gly Thr Ile Phe Ser Asn Asn Ala
1 5

<210> 34

<211> 8

10 <212> PRT

<213> Lama glama

<400> 34

Gly Ser Val Phe Ser Leu Pro Thr
1 5

<210> 35

<211> 8

15 <212> PRT

<213> Lama glama

<400> 35

Gly Thr Ile Ser Ser Phe Ile Ala
1 5

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

20 <213> Lama glama

<400> 36

Gly Thr Ile Phe Ser Pro Asn Thr
1 5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

30 <213> Lama glama

<400> 37

Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala
1 5

<210> 38

<211> 8

<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 38

Gly Ser Arg Phe Ser Phe Ile Thr
1 5

5 <210> 39
<211> 8
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 39

10 Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala
1 5

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

<400> 40

Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Glu
1 5

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

<400> 41

Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ser
1 5

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

<400> 42

30 Gly Ser Ile Phe Ser Leu Asn Ala
1 5

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

35 <400> 43

Ile His Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

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

<400> 44

Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

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

<400> 45

Ile Ser Ser Gly Gly Arg Leu
1 5

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

<400> 46

Val Thr Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

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

<400> 47

Ile Thr Ser Gly Arg Ser Thr
1 5

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

30 <400> 48

Ile Thr Ser Gly Gly Ser Val
1 5

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

<400> 49

Ile Thr Gly Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 50

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Lama glama

<400> 50

Ile Thr Ser Gly Gly Glu Thr
1 5

<210> 51

<211> 7

10 <212> PRT
<213> Lama glama

<400> 51

Ile Thr Ser Gly Gly Ser Arg
1 5

<210> 52

<211> 7

15 <212> PRT
<213> Lama glama

<400> 52

Ser Thr Ser Gly Asp Ile Thr
1 5

<210> 53

<211> 6

20 <212> PRT
<213> Lama glama

<400> 53

Leu Ser Gly Asp Asn Thr
1 5

<210> 54

<211> 8

30 <212> PRT
<213> Lama glama

<400> 54

Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 55

<211> 7

<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 55

Ile Thr Thr Gly Gly Asn Thr
1 5

5 <210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 56

Ile Thr Ser Asp Gly Ser Thr
1 5

10 <210> 57
<211> 14
<212> PRT
<213> Lama glama

15 <400> 57

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

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

<400> 58

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

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

<400> 59

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

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

<400> 60

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

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

5 <400> 61

Tyr Tyr Arg Ser Thr Phe Thr Glu Tyr
 1 5

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

10

<400> 62

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

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

15

<400> 63

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

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

20

<400> 64

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

<210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Lama glama

25

<400> 65

Arg Gly Thr Ser Val Leu Tyr Asp Val
 1 5

30

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

35 <400> 66

ES 2 771 479 T3

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

Tyr

<210> 67
<211> 10
<212> PRT
5 <213> Lama glama

<400> 67

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

<210> 68
<211> 17
10 <212> PRT
<213> Lama glama

<400> 68

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

Tyr

<210> 69
15 <211> 17
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 69

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

Tyr

<210> 70
20 <211> 17
<212> PRT
<213> Lama glama

<400> 70

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

Tyr

REIVINDICACIONES

- 5 1. Nanocuerpo que se une específicamente a un epítipo conformacional comprendido en un sitio de unión a proteínas G de un estado conformacional activo de un GPCR, estabilizando así dicho estado conformacional activo del GPCR, donde dicho estado conformacional activo de dicho GPCR **se caracteriza por** una afinidad mejorada de dicho GPCR por un agonista, donde dicho nanocuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:29, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de aminoácidos con SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:29.
- 10 2. Nanocuerpo según la reivindicación 1, donde dicho nanocuerpo es capaz de unirse específicamente a un GPCR unido a un agonista.
3. Nanocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dicho nanocuerpo es capaz de aumentar la termoestabilidad del estado conformacional activo del GPCR tras la unión.
- 15 4. Nanocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicho GPCR es una proteína de mamífero o una proteína vegetal o una proteína microbiana o una proteína vírica o una proteína de insecto, en particular una proteína humana.
5. Complejo que comprende (i) un nanocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, (ii) un GPCR en un estado conformacional activo y (iii), opcionalmente, un ligando del receptor.
6. Complejo según la reivindicación 5, donde dicho complejo está en una forma solubilizada o inmovilizado en un soporte sólido.
- 20 7. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 5-6, donde dicho complejo es cristalino.
8. Composición celular que comprende un nanocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y/o un complejo según la reivindicación 5.
- 25 9. Uso *ex vivo* de un nanocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o de un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 5-7 o una composición celular según la reivindicación 8 para estabilizar y/o inducir un estado conformacional activo de un GPCR.
10. Uso *ex vivo* según la reivindicación 9 para cristalizar y/o para resolver la estructura de un GPCR en un estado conformacional activo.
- 30 11. Uso *ex vivo* de un nanocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 5-7 o una composición celular según la reivindicación 8 para atrapar un GPCR en un estado conformacional activo, en particular para atrapar un GPCR en un estado conformacional activo en complejo con un ligando del receptor.
12. Método de atrapamiento de un GPCR en un estado conformacional activo, donde dicho método incluye los pasos de:
 - 35 a. aplicar una solución que contiene un GPCR en una pluralidad de estados conformacionales a un soporte sólido que posee un nanocuerpo inmovilizado según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y
 - b. formar un complejo del nanocuerpo y el GPCR, y
 - c. eliminar las moléculas unidas débilmente o no unidas,
 donde el GPCR es atrapado en un estado conformacional activo.
13. Método según la reivindicación 12, donde dicho método comprende además el paso de purificar el complejo.
- 40 14. Uso *ex vivo* del nanocuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para modular una actividad de señalización de GPCR.

Figura 1

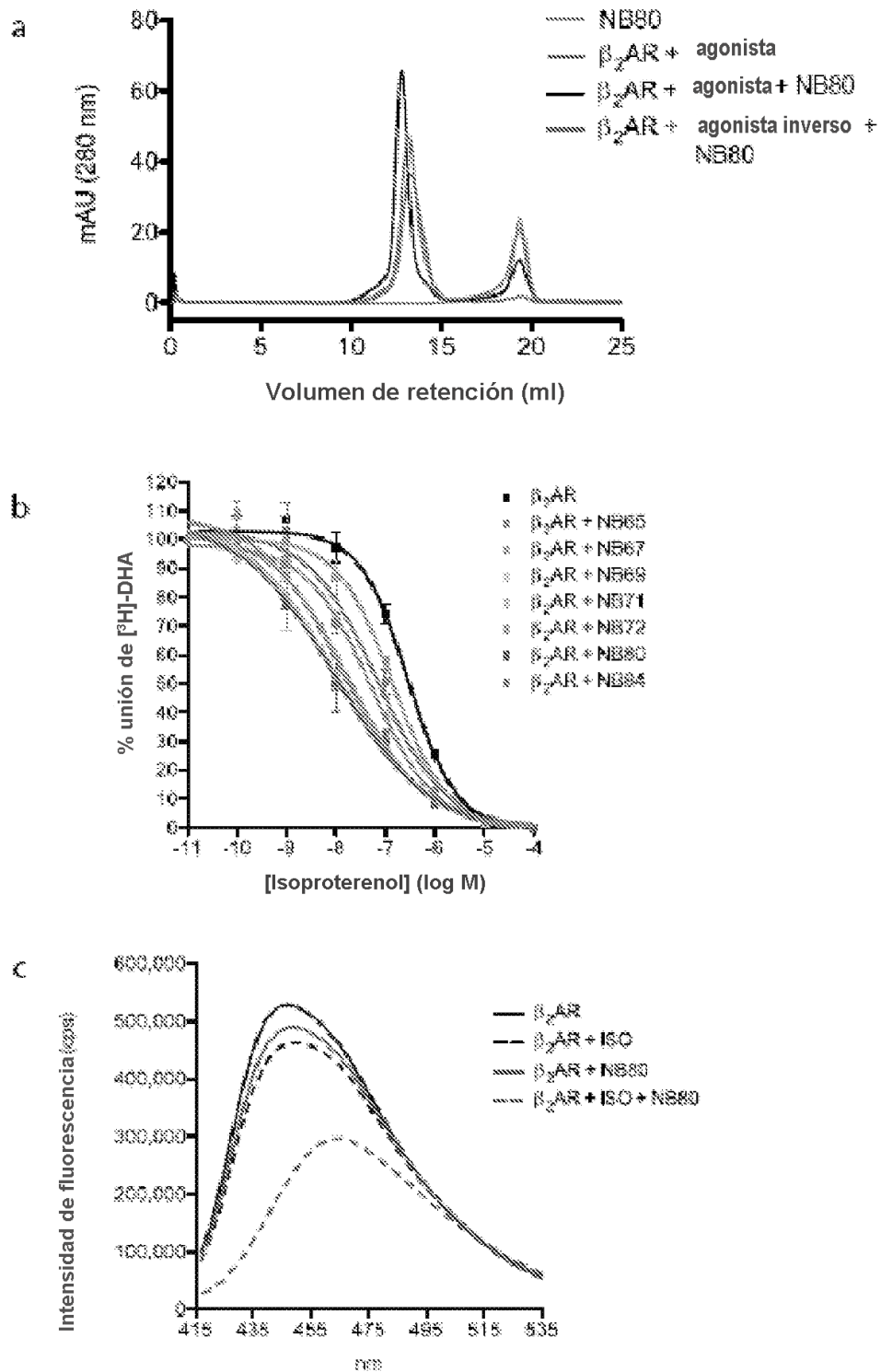


Figura 2

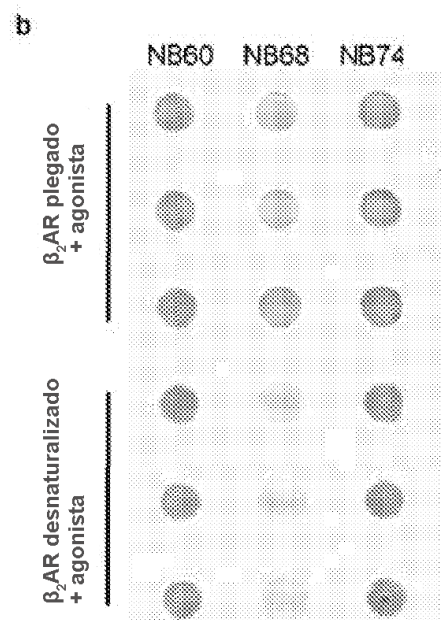
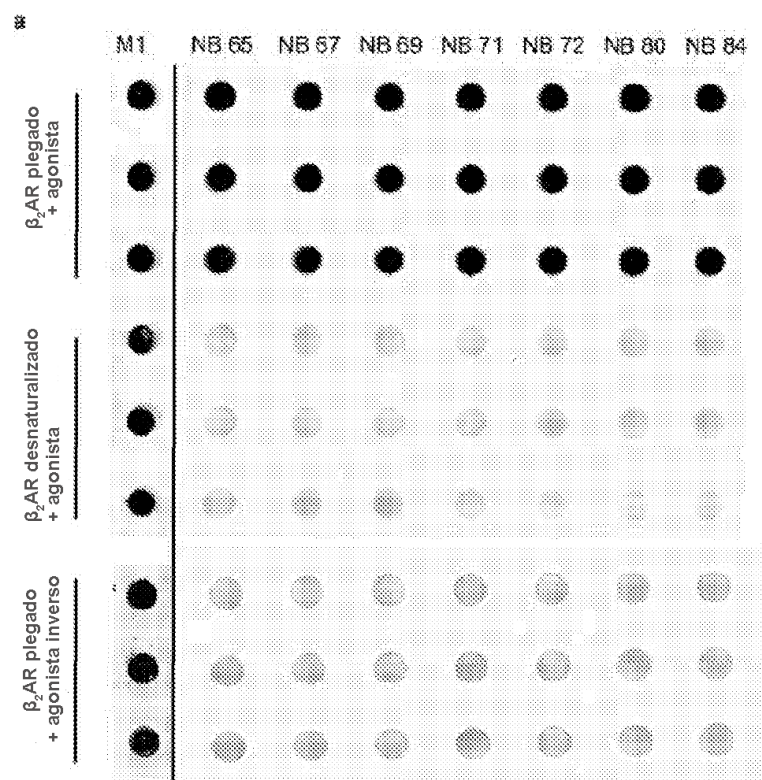
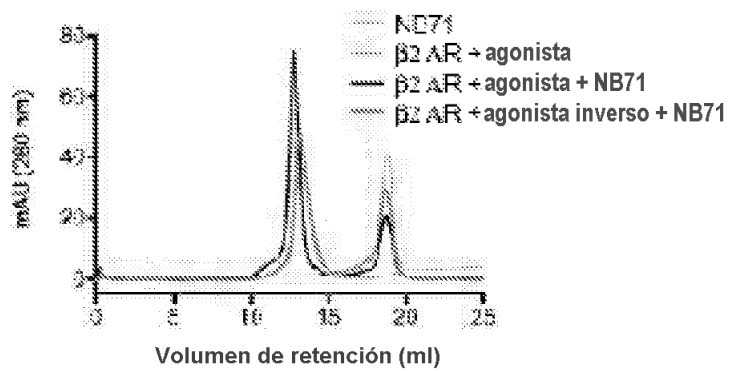
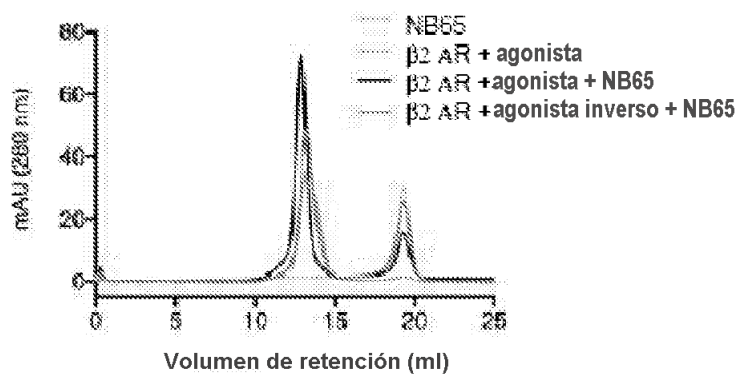
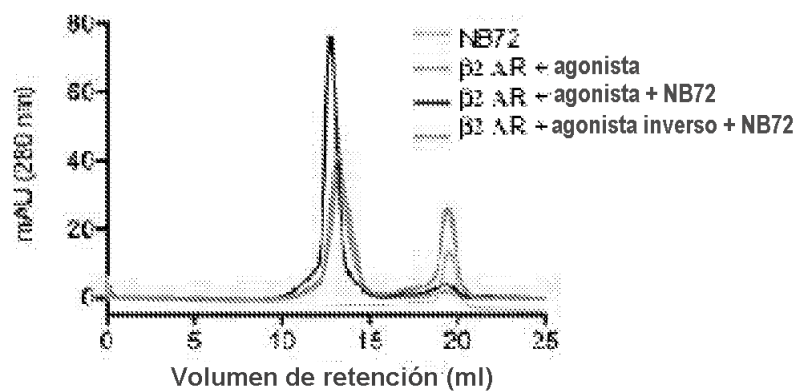


Figura 3



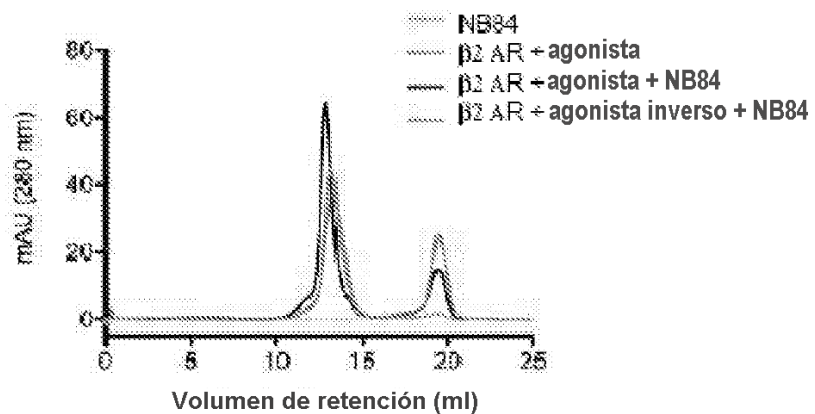
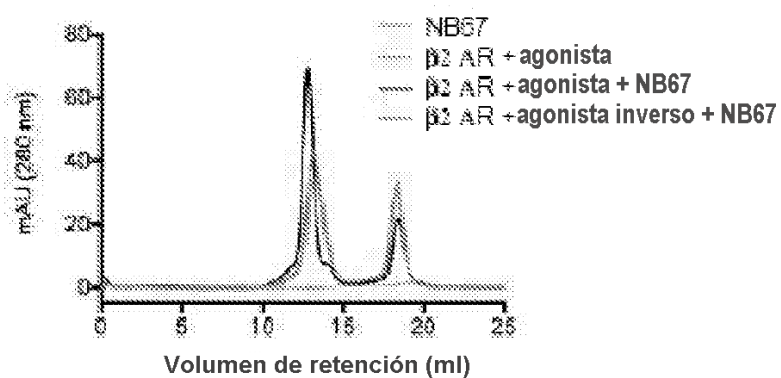
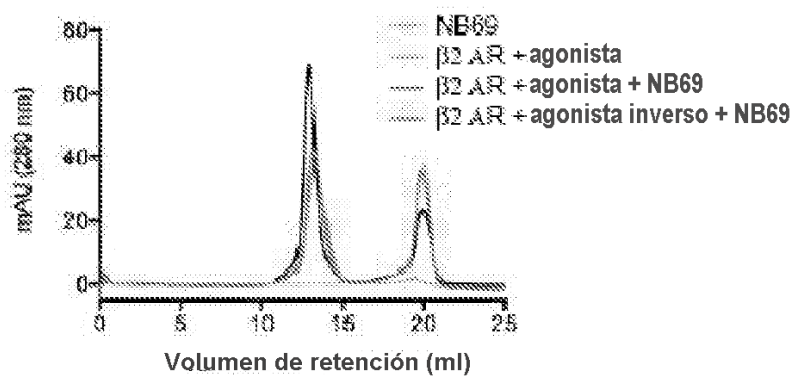


Figura 4

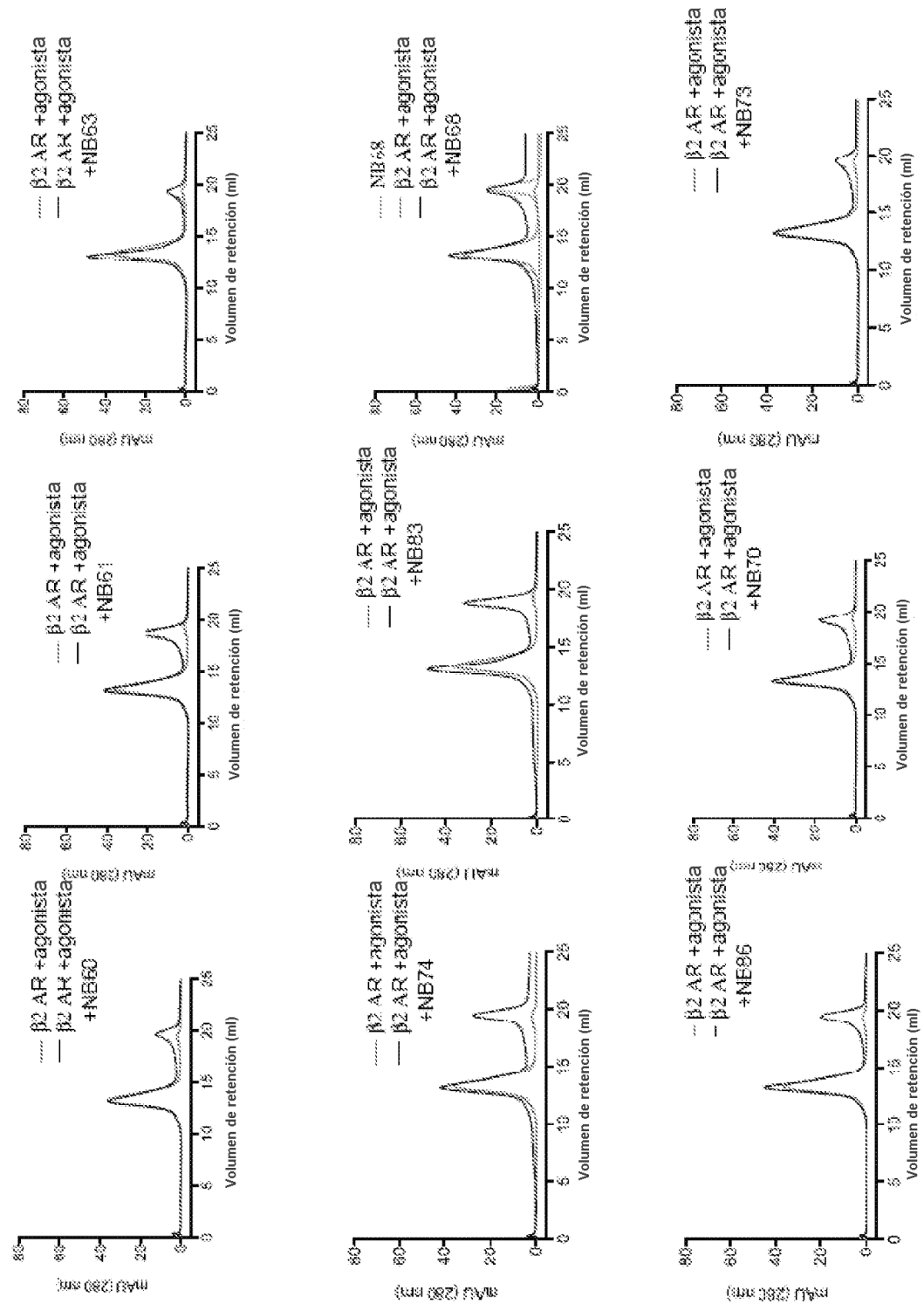
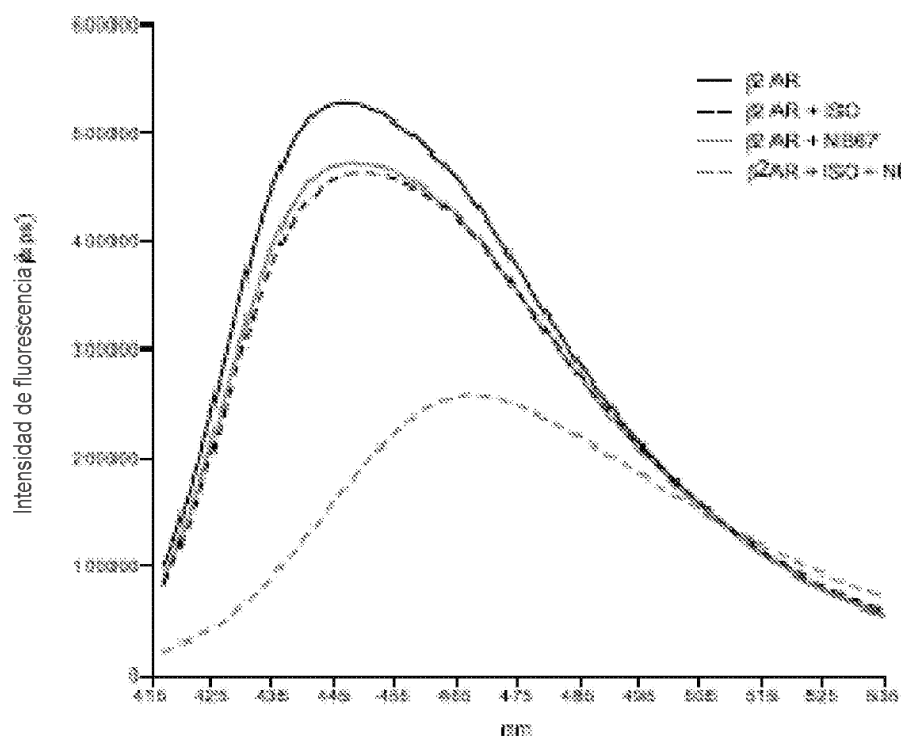
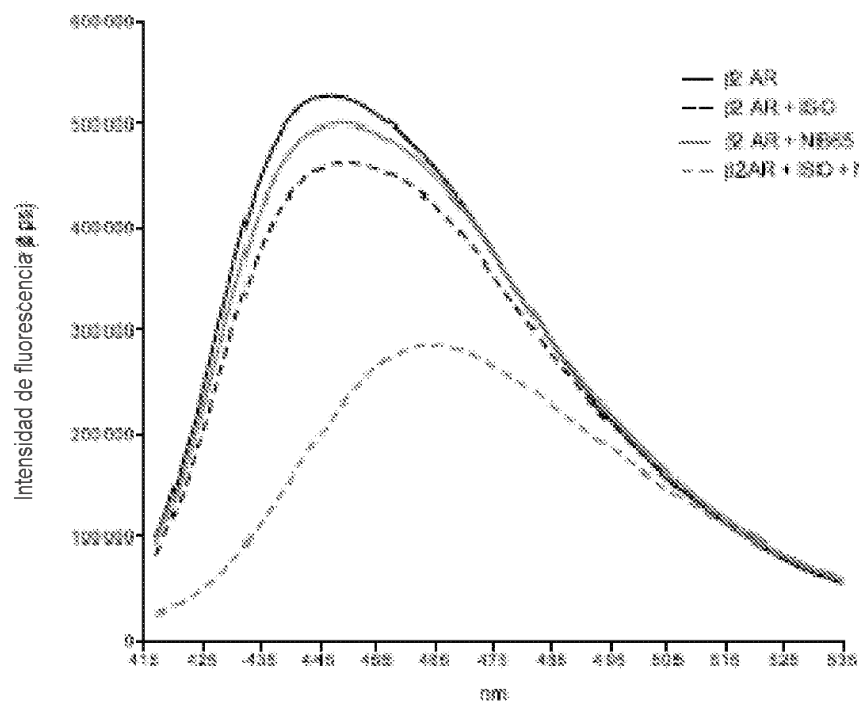
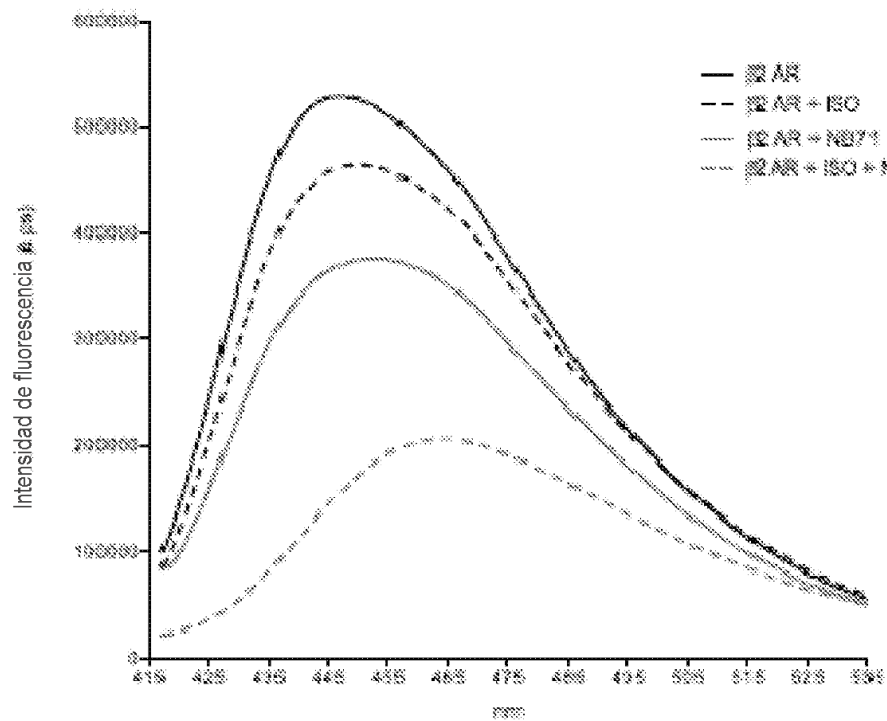
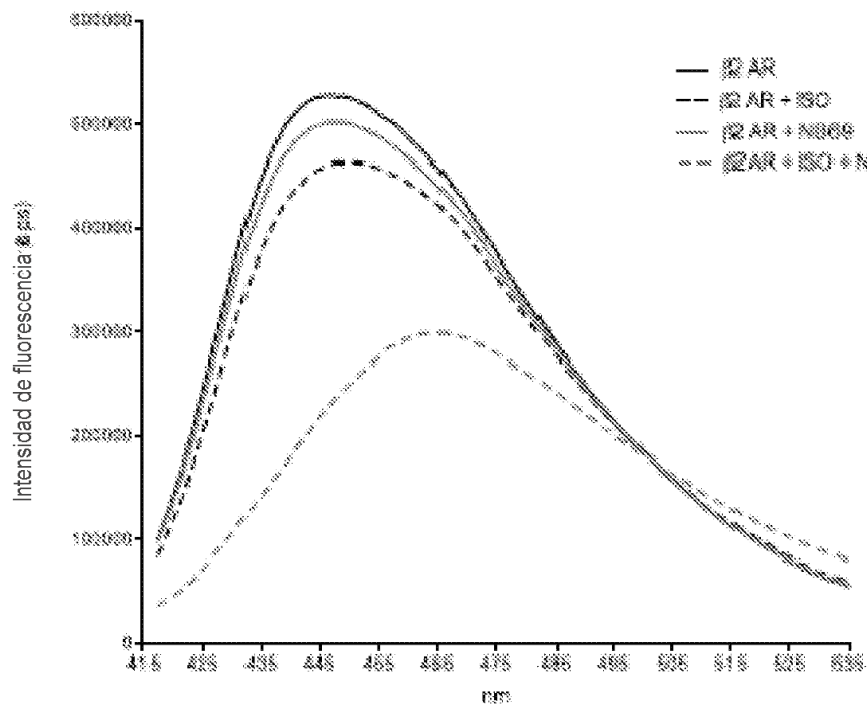


Figura 5





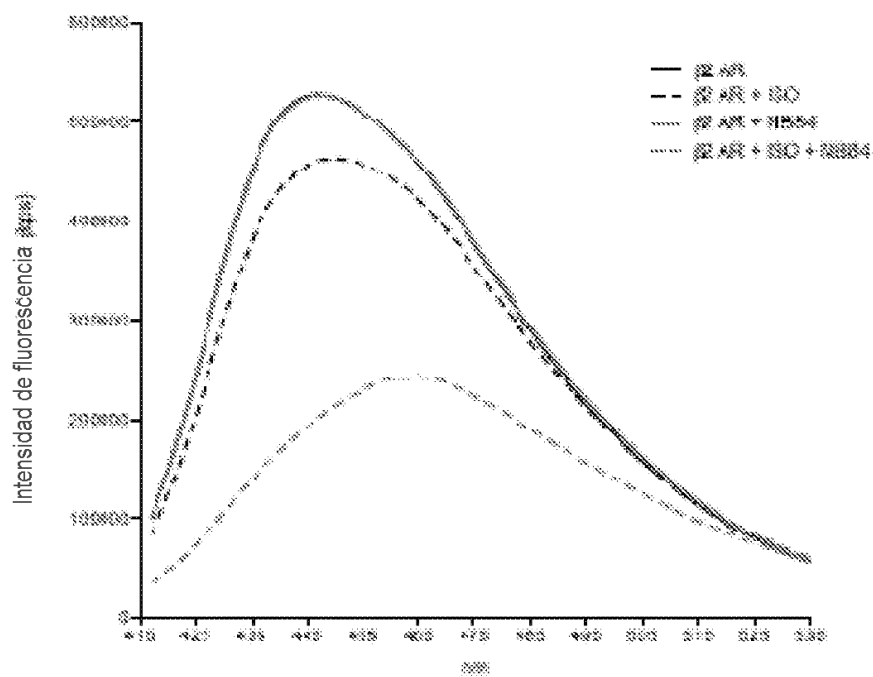
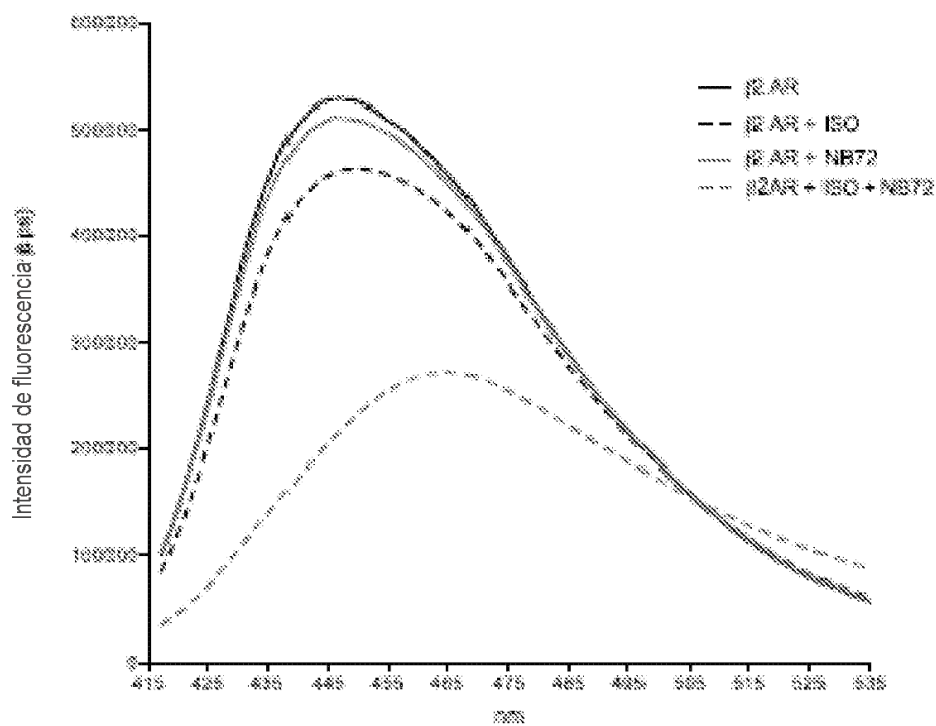


Figura 6

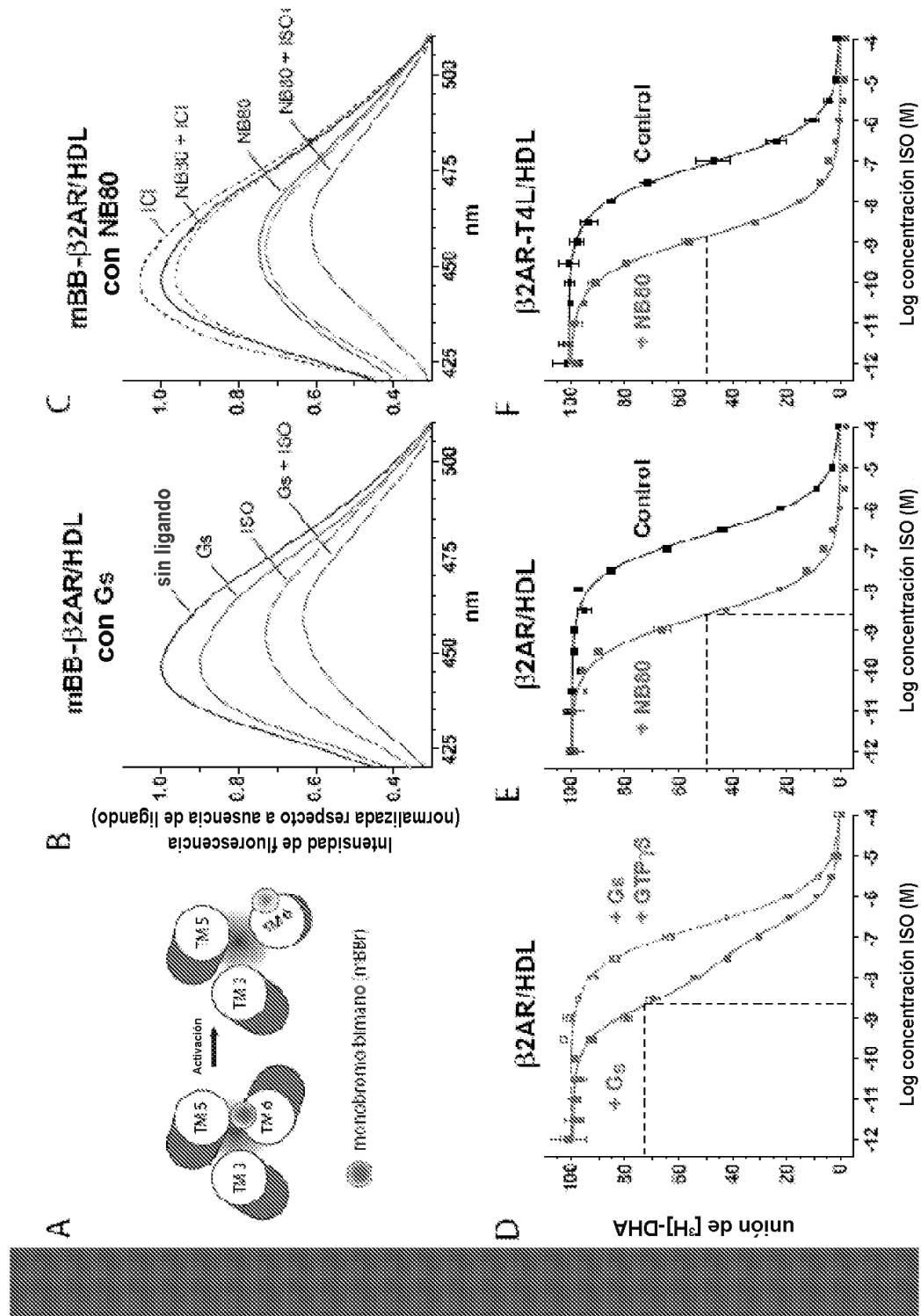


Figura 7

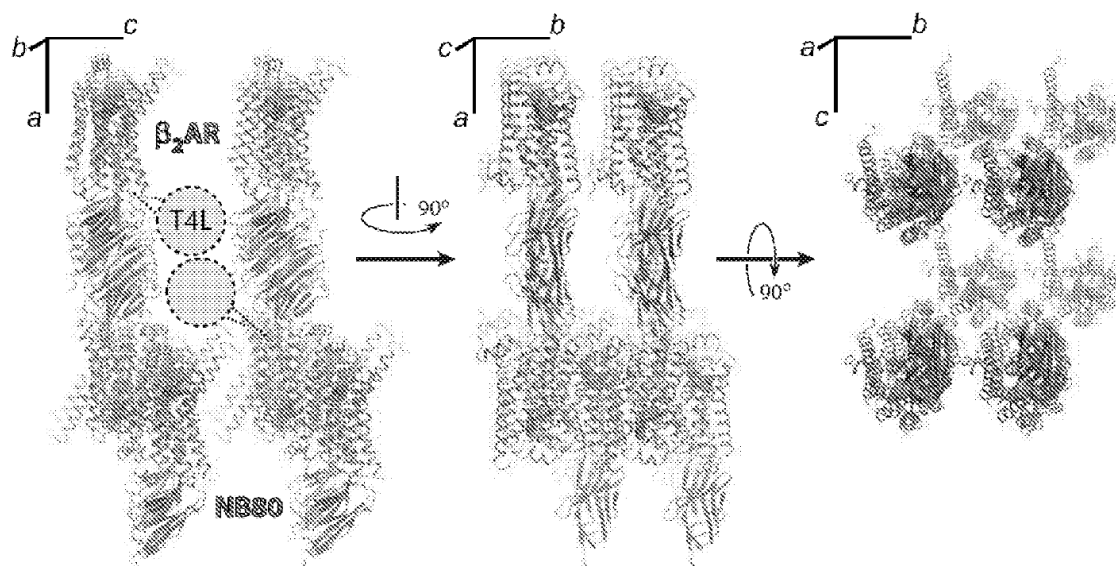


Figura 8

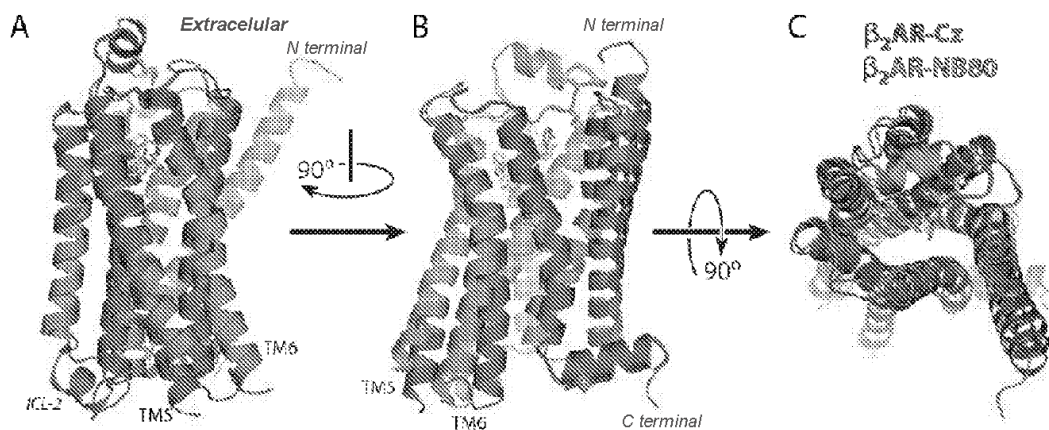


Figura 9

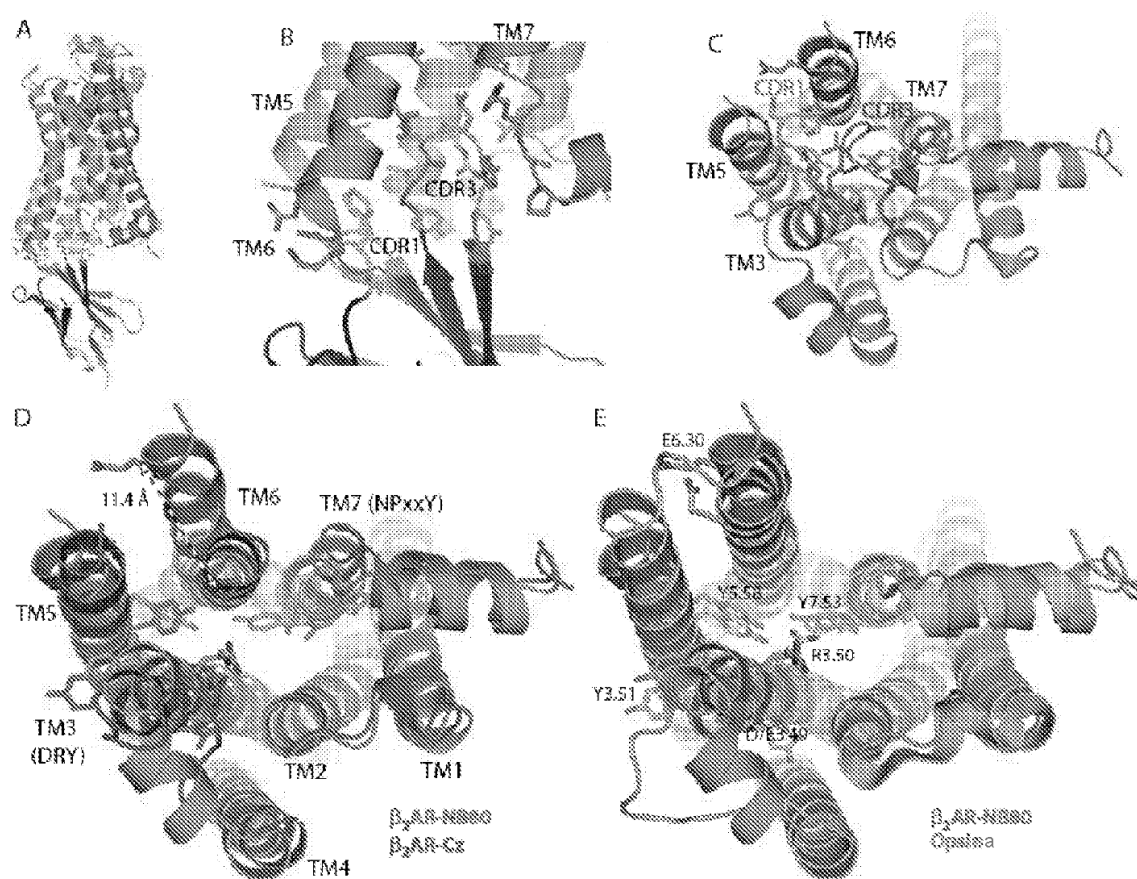


Figura 10

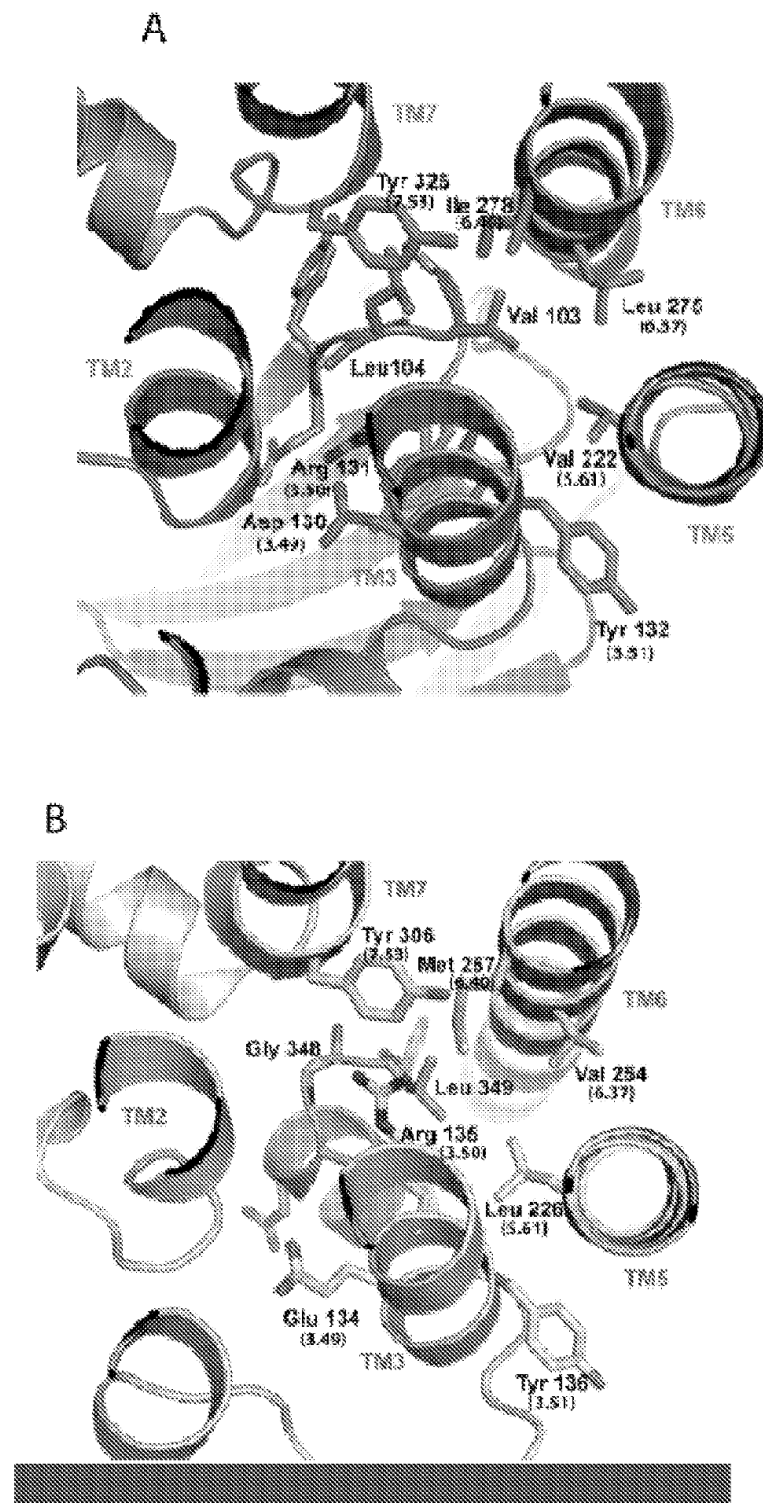


Figura 11

Estado inactivo

Estado activo

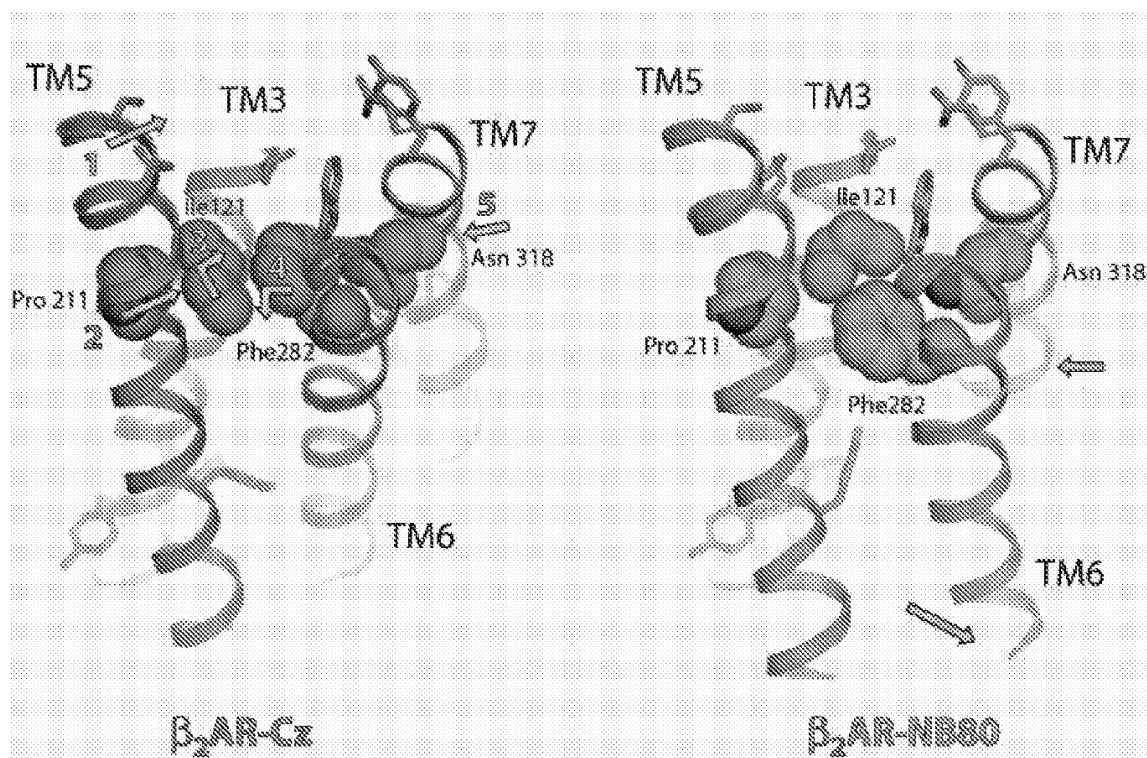


Figura 12

beta2AR humano

[illegible]

Figura 13

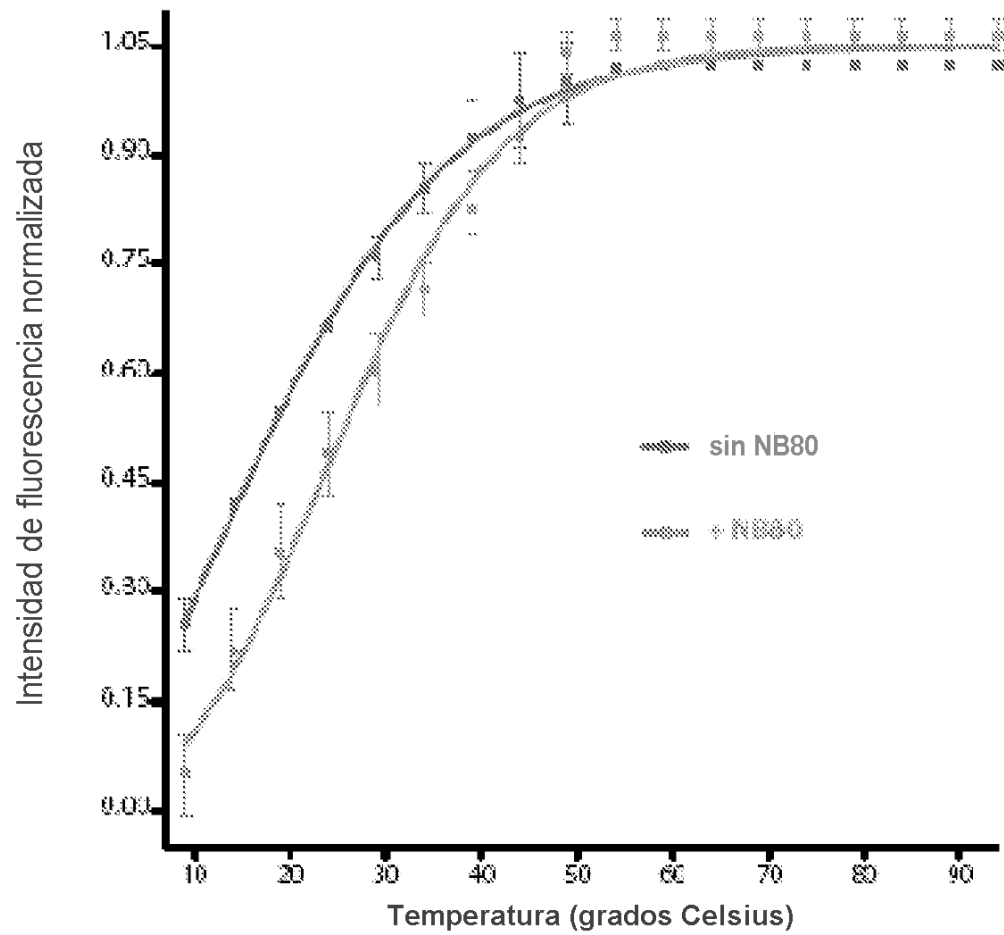
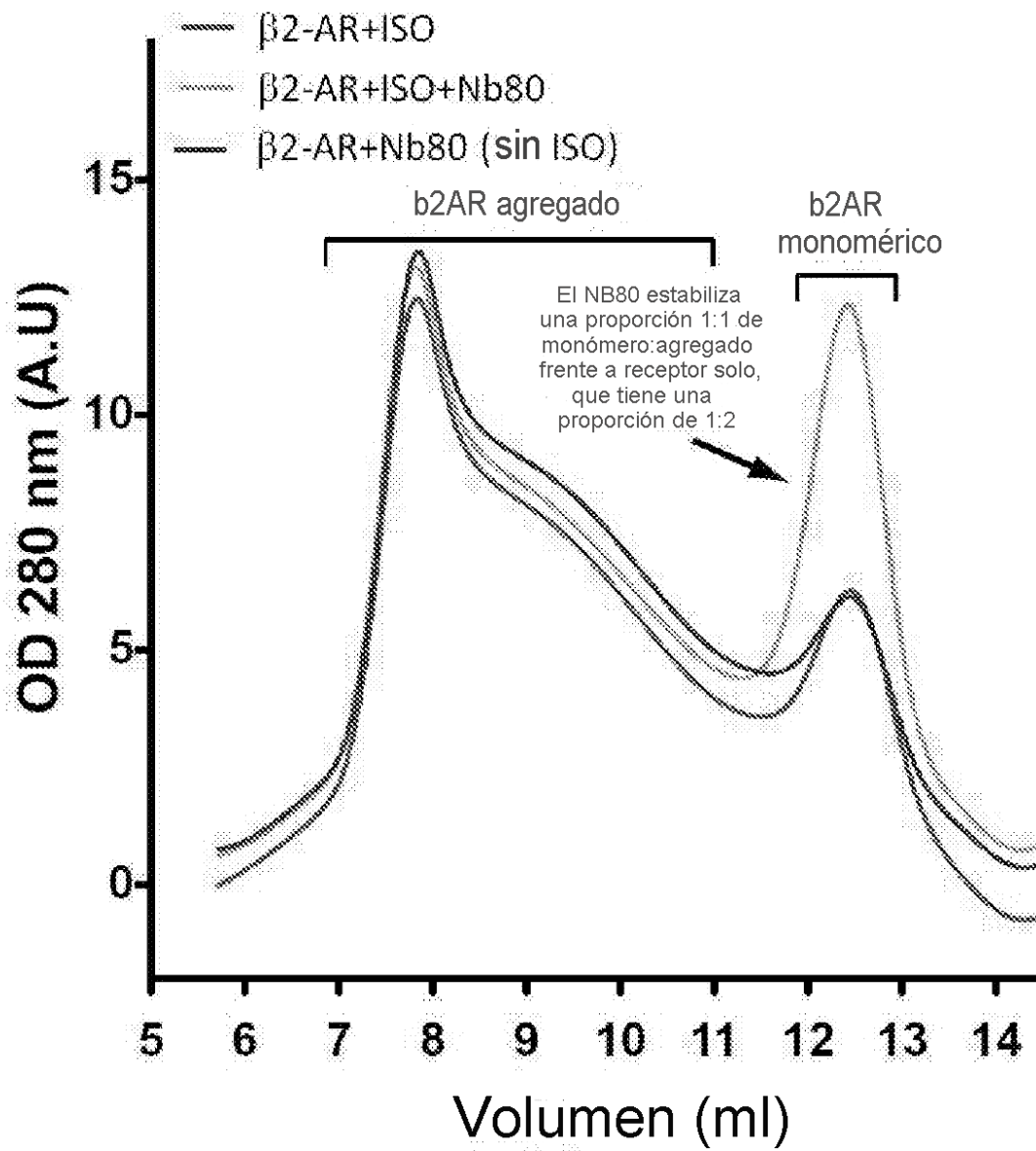


Figura 14

A



B

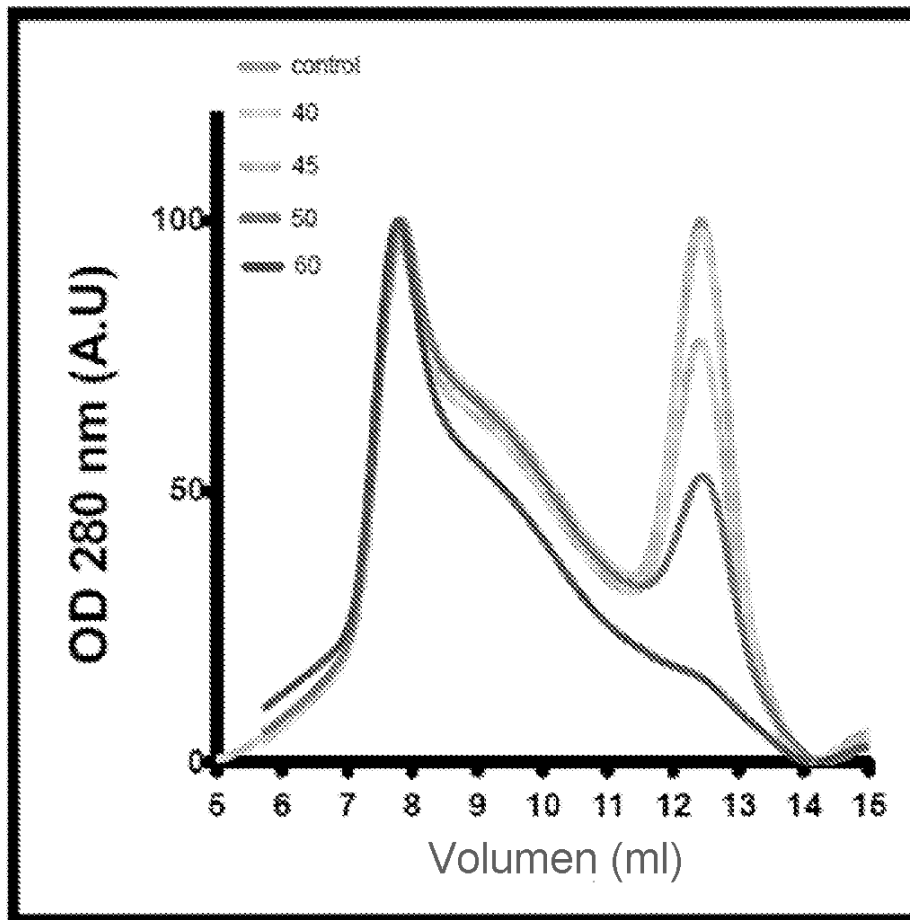


Figura 15

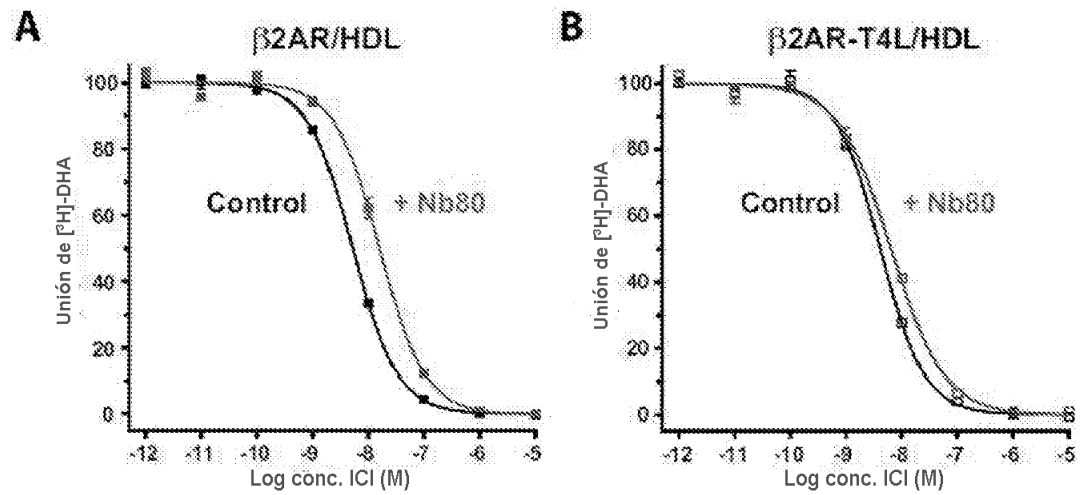
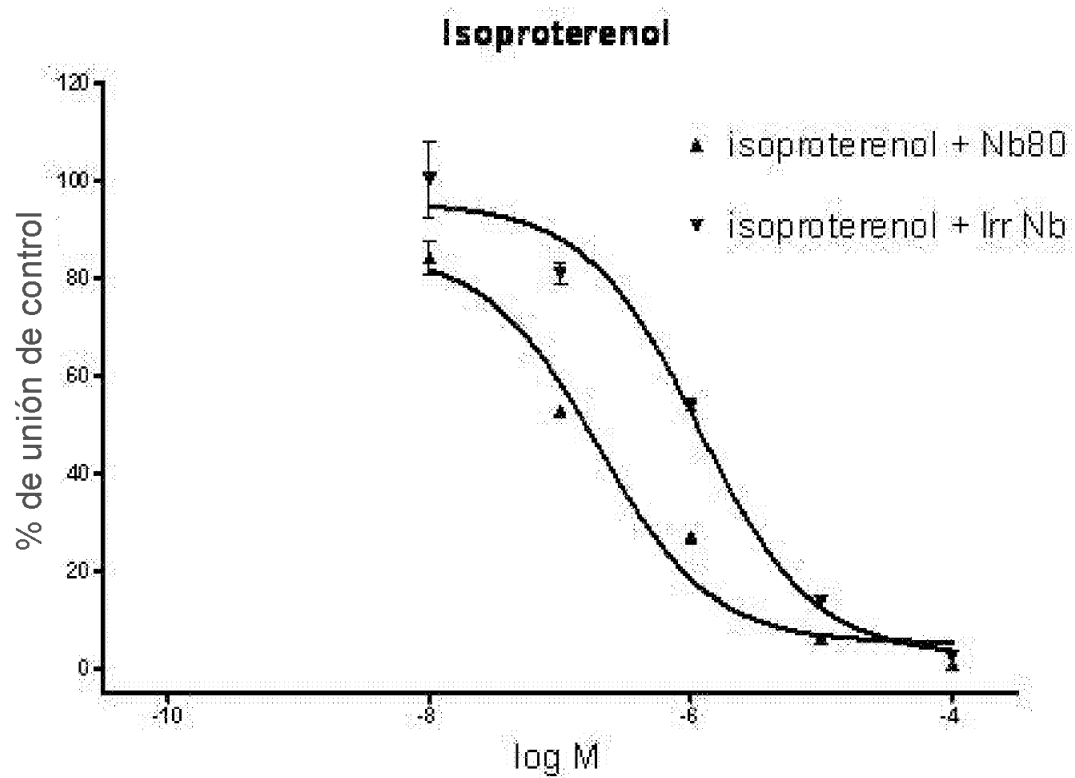
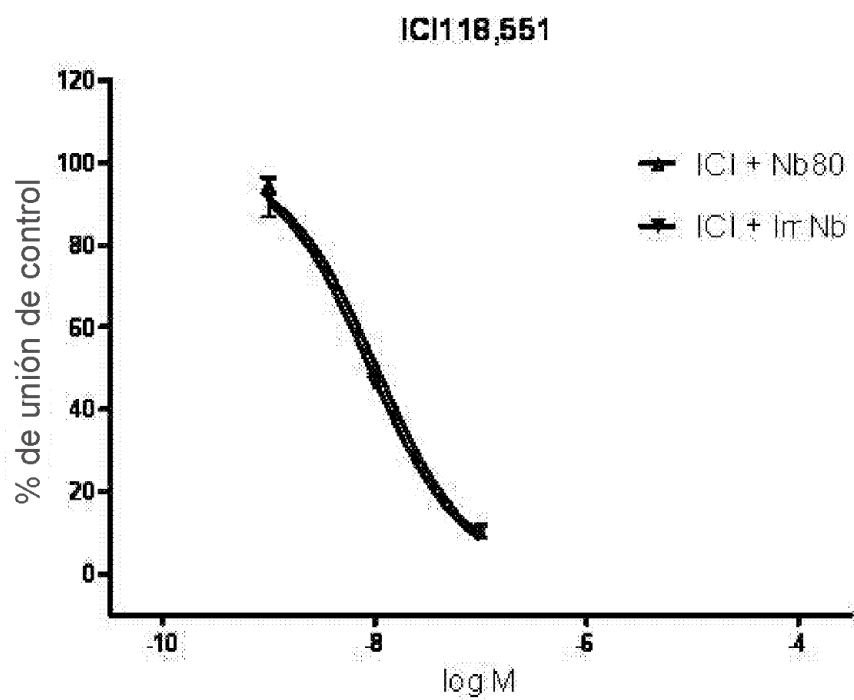
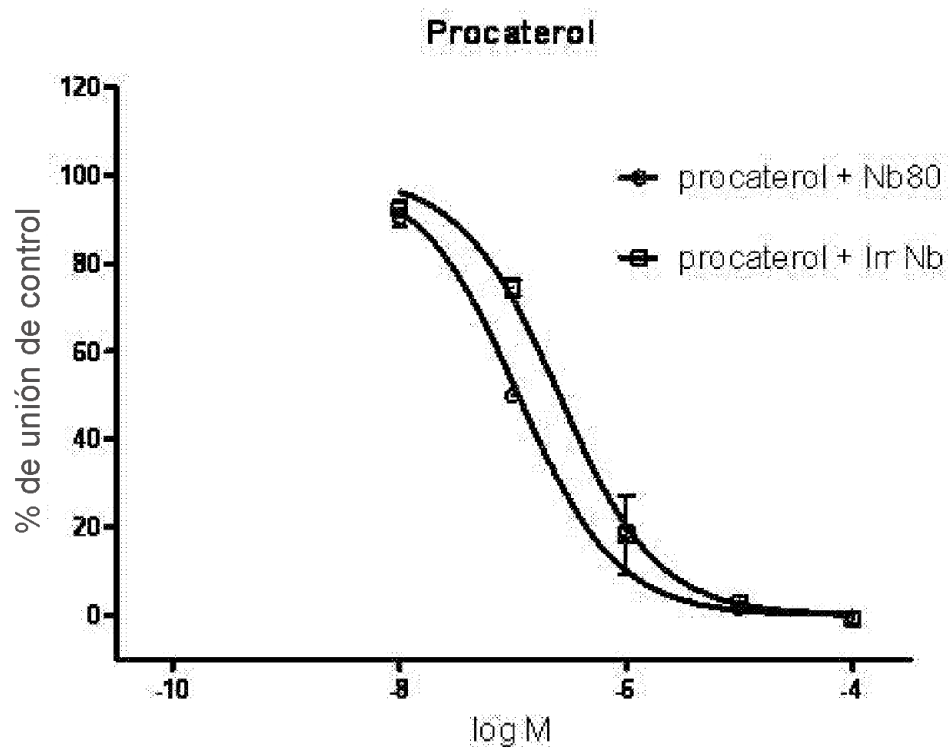


Figura 16





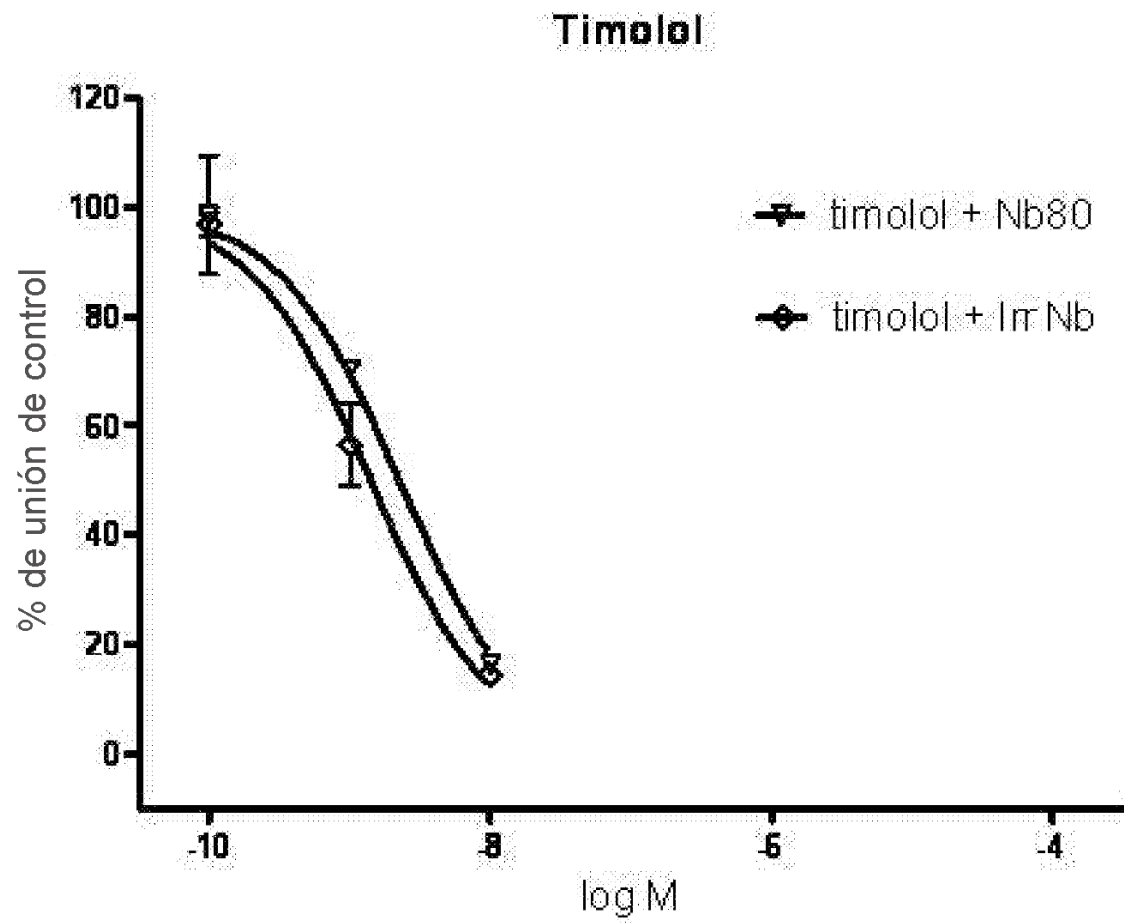


Figura 17

```

β2AR MGQ-----PGNGS-----AFL LAPNGSHA----PDHDVTQERDEVVVVG 35
β1AR MGAGVLVLGASEPGNLSSAAPLPDGAATAARLLVPASPPASLLPPASESPEPLSQQWTAG 60
      **                *** *                * *. * .. *      * : .: .: *..*

β2AR MGIVMSLIVLAIVFGNVLVITAIKFERLQTVTNYFITSLACADLMGLAVVPFGAAHIL 95
β1AR MGLLMALIVLLIVAGNVLVIVAIKTPRLQTLTNLFIMSLASADLMGLLVVPFGATIVV 120
      **: :*:***** ** *****.***** *****: ** ** ***.***** *****: ::

β2AR MKMWTFGNFWCEFWTSIDVLCVTASIETLCVIAVDRYFAITSPFFYQSLLTKNKARVIL 155
β1AR WGRWEYGSFFCELWTSVDVLCVTASIETLCVIALDRYLAITSPFFYQSLLTRARARGLVC 180
      * :*.*:***:***:*****:*****:***:*****:*****: :* :

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

β2AR VFVYSRVFQEAKRQLQKIDKSEGRFH-----VQNLSQVEQ----- 250
β1AR AFVYLRVFREAQKQVKKIDSCERRFLGGPARPPSPSPSPVPAPAPPPGPPRPAAAAATAP 300
      .*** **:***:***:***:***. * * . * *

β2AR --DGRTGHGLRRSSKFCLEHKALKTLGIIMGTFTLCWLPFFIVNIVHVIQDNLIRKEVY 308
β1AR LANGRAGK-RRPSRLVALEQKALKTLGIIMGVFTLCWLPFFLANVVKAFHRELVPDRLF 359
      :*: *: * * ..*:*:*****.*****:*.*: : : :*: :*:

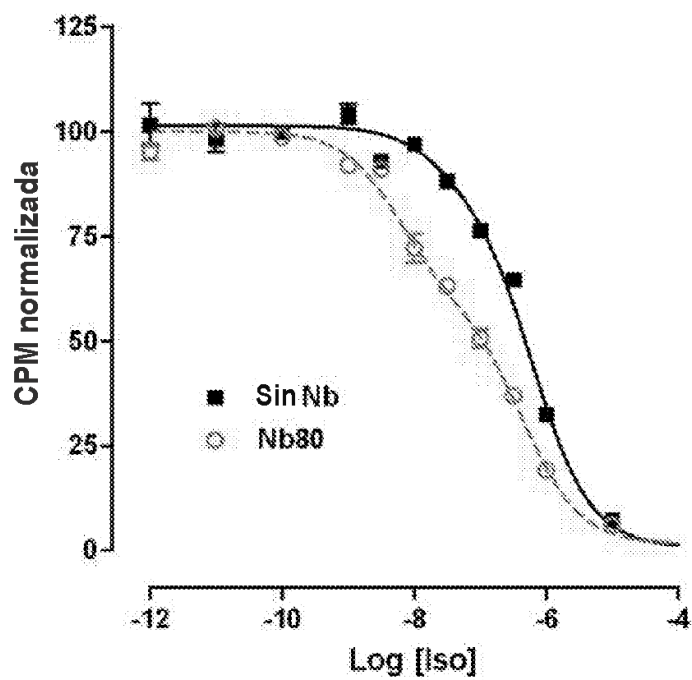
β2AR ILLNWIGYVNSGFNPLIYCRSPDFRIAFQELLCLRRSSLK---AYGNGYSSNGNTGEQ- 363
β1AR VFFNWLGYANSAFNPIIYCRSPDFRKAFQRLLCCARRAARRRHATHGDRPRASGCLARPG 419
      :*:***:***.***.***:***** *****.*** * : : :*: :*. ..

β2AR ---SGYHVEQEKENKLLCEDLPG--TEDFVGHQGTVPSDNIDSQGRNCS---TNDSSL 413
β1AR PPPSPGAASDDDDDDVVGATPPARLLEPWAGCNGGAAADSDSSLDEPCRPGFASESKV 477
      * ..*: :*: * . * :. * :* ..* . * .. * :*: :

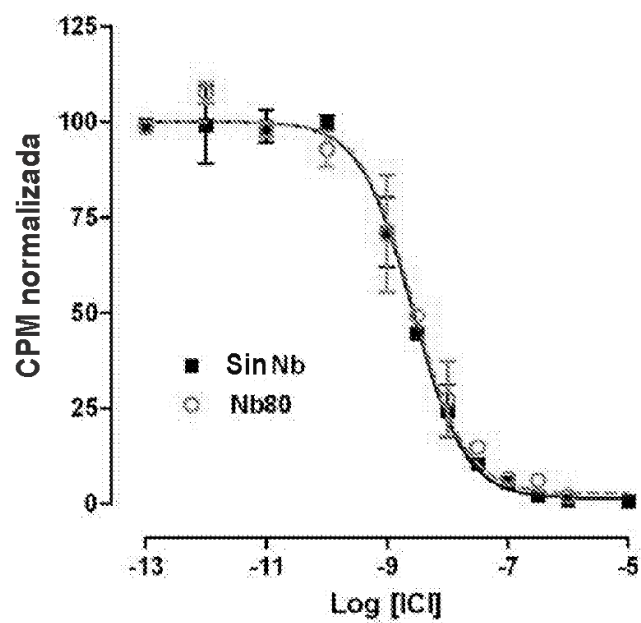
```

Figura 18

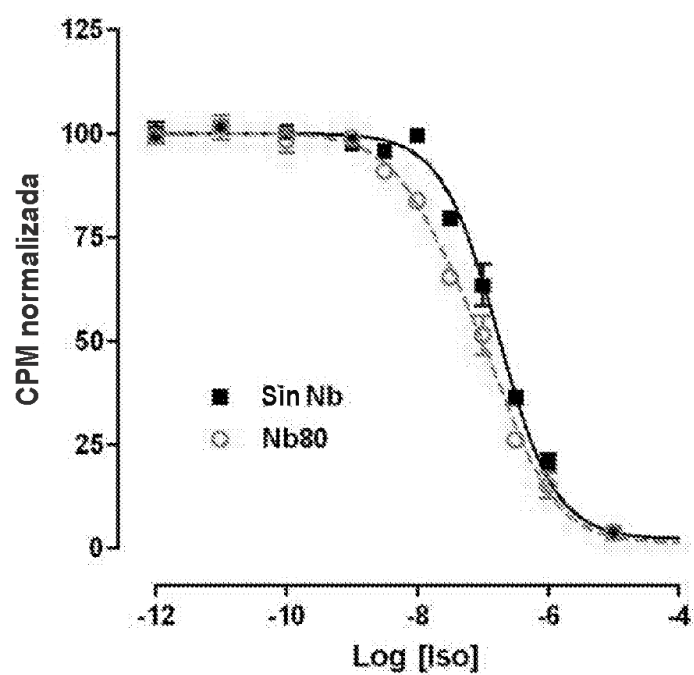
A



B



C



D

