

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 006 458**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/566 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2008 E 12192130 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024 EP 2573563**

(54) Título: **Cribado**

(30) Prioridad:

20.12.2007 GB 0724860

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2025

(73) Titular/es:

NXERA PHARMA UK LIMITED (100.00%)
Granta Park Great Abington
Cambridge, Cambridgeshire CB21 6DG, GB

(72) Inventor/es:

WEIR, MALCOLM PETER y
MARSHALL, FIONA HAMILTON

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 006 458 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**Cribado**

La presente invención se refiere al cribado de las parejas de unión de los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) y, en particular, a las parejas de unión específicas de la conformación de los GPCR.

5 La inclusión o discusión de un documento aparentemente publicado anteriormente en esta memoria descriptiva no debe tomarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es de conocimiento general común.

10 Los GPCR constituyen una familia muy grande de proteínas que controlan muchos procesos fisiológicos y son las dianas de muchos fármacos eficaces. Por lo tanto, tienen una importancia farmacológica considerable. Se proporciona una lista de GPCR en Foord *et al* (2005) *Pharmacol Rev.* **57**, 279-288. Los GPCR son generalmente inestables cuando se aíslan y, a pesar de los considerables esfuerzos, solo ha sido posible cristalizar la rodopsina bovina, que naturalmente es excepcionalmente estable, y el receptor beta adrenérgico 2 que se cristalizó como una proteína de fusión o en complejo con un fragmento de anticuerpo.

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

20 Se cree que los GPCR existen en múltiples conformaciones distintas que están asociadas con diferentes clases farmacológicas de ligandos, tales como agonistas y antagonistas, y que alternan entre estas conformaciones para funcionar (Kenakin T. (1997) *Ann N Y Acad Sci* **812**, 116-125). El cambio entre conformaciones contribuye a la dificultad de obtener estructuras cristalinas de los receptores.

25 La generación de parejas de unión a los GPCR de conformación específica se ve obstaculizada por varios factores. Por ejemplo, los GPCR generalmente tienen una estabilidad deficiente cuando se retiran de su entorno de membrana nativo, lo que restringe severamente el rango de condiciones que pueden explorarse sin su desnaturalización o precipitación inmediata. La incapacidad de producir GPCR purificados en su conformación nativa impide su uso en un amplio rango de paradigmas de cribado que dependen del uso de receptores purificados. Por lo tanto, el cribado de GPCR ha dependido tradicionalmente de ensayos en los que el receptor está presente en las membranas celulares o en células completas.

30 Muchos GPCR representan dianas terapéuticas importantes que podrían ser explotadas por productos bioterapéuticos tales como los anticuerpos. La generación de anticuerpos terapéuticos para los GPCR ha sido extremadamente difícil debido, en parte, a la falta de un inmunógeno adecuado. La ruta habitual es tomar pequeños fragmentos peptídicos del receptor para la inmunización; sin embargo, estos no retienen su conformación nativa y, a menudo, dan como resultado parejas de unión que pueden unirse a y etiquetar el receptor, pero que no tienen actividad agonista o antagonista funcional. Debido a la conformación física única de los GPCR, también se sabe que los productos bioterapéuticos, como los anticuerpos, reconocen combinaciones de "bucle" polipeptídicos, características que se pierden cuando los fragmentos peptídicos se usan de forma aislada. Es bien sabido que el entorno de membrana local de los GPCR mantiene la conformación terciaria de la proteína y gobierna qué epítopos están presentes en la superficie extracelular. En teoría, los agentes bioterapéuticos pueden reconocer estos epítopos; sin embargo, no es trivial crear productos bioterapéuticos, como anticuerpos, contra membranas o fragmentos de membrana que contienen un GPCR diana, ya que estas preparaciones contienen inevitablemente otros GPCR no diana y proteínas asociadas a la membrana, y otros componentes de la membrana, como lipoproteínas, apolipoproteínas, lípidos, lípidos de fosfoinositol, y liposacáridos, que pueden actuar como antígenos no deseados en el proceso de selección y producción de productos bioterapéuticos.

35 Hemos desarrollado una metodología para la estabilización de un GPCR en una conformación biológicamente relevante en particular. Dichos receptores tienen una serie de ventajas como inmunógenos y/o reactivos de selección y cribado para la generación de parejas de unión. En particular, son útiles para la generación de parejas de unión específicas de conformación, que con frecuencia tendrán propiedades funcionales y que anteriormente han demostrado ser muy difíciles de generar.

40 Por ejemplo, la estabilidad del receptor nativo correctamente plegado a lo largo de las etapas de expresión, solubilización y purificación facilita un alto rendimiento del GPCR purificado (cantidades en miligramos de cultivos celulares a escala de laboratorio). Además, la estabilidad de la proteína plegada en un rango de detergentes y tampones y aditivos de solubilización, sin distorsionar la función, permite optimizar las condiciones de la inmunización, inmovilización en superficies sólidas sin desnaturalización (por ejemplo, placas de plástico, resinas, perlas o portaobjetos, directamente o mediante etiquetas de afinidad, como etiquetas de polihistidina), con el fin de producir y cribar anticuerpos o para el cribado de bibliotecas (como bibliotecas de aficuerpos, anticuerpos, fagos o moléculas pequeñas). Para el cribado de bibliotecas, la reducción de la unión no específica mediante la eliminación de la materia membranosa y los "antígenos pegajosos" de la superficie celular proporcionará una mejora importante en la señal/ruido. También hace posible el uso de detergentes de cadena corta con grupos de cabeza altamente polares o cargados (como óxido de laurildimetilamina, octil D-glucósido u octil D-maltósido), lo que revelará una mayor

proporción de las superficies antigenéticas del GPCR que están enmascaradas por detergentes de cadena más larga, como n-dodecil beta-D-maltósido (Bamber *et al.*, PNAS 103 (2006) 16224-16229). La captura de conformaciones funcionales particulares del receptor también aumentará la probabilidad de generar parejas de unión funcionales específicas de la conformación.

- 5 El documento US 2007/154947 A1 describe un biodiscriminador químico. El documento US 7 094 593 B1 describe un método para mejorar la función de los receptores acoplados a proteína G heterólogos. El documento WO 2008/114020 A describe proteínas mutantes y métodos para seleccionarlas. El documento WO 01/58916 A2 describe el receptor de quimiocinas de proteína G humana (CCR5) HDGNR10. El documento WO 2009/055512 A2 describe métodos y composiciones para obtener cristales de alta resolución de proteínas de membrana. Kitabgi *et al.*, Peptides. 2006 oct;27(10):2461-8. describe los dominios funcionales del receptor de neurotensina de subtipo 1 (NTS1). Zhang Yang *et al.*, PLoS Comput Biol. 2006 feb;2(2):e13. describe el modelado de la estructura de todos los receptores acoplados a proteína G identificados en el genoma humano. Roth Christopher B. *et al.*, Mol Biol. 2008 mar 7;376(5):1305-19. describe la estabilización de la interfaz helicoidal TM4-TM3-TM5 del receptor β 2 adrenérgico humano mediante la mutagénesis de Glu1223.41, un residuo crítico en la estructura del GPCR. El documento WO 2009/071914 A2 describe proteínas mutantes y métodos para producirlas. El documento WO 2004/040000 A2 describe los receptores acoplados a proteína G y los usos de los mismos.

La presente invención proporciona un biosensor que comprende un mutante de un receptor acoplado a proteína G (GPCR) humana de tipo salvaje que tiene una termoestabilidad conformacional aumentada en comparación con el GPCR humano de tipo salvaje; en donde: (i) el mutante es un receptor β -adrenérgico mutante que, en comparación con el correspondiente receptor β -adrenérgico de tipo salvaje, tiene al menos el reemplazo de un aminoácido en una posición que, cuando se utilizan MacVector y CLUSTALW, se alinea en una o más de las siguientes posiciones según la numeración del receptor β -adrenérgico de pavo tal como se establece en la SEQ ID NO: 1: I55, G67, R68, V89, M90, G98, I129, S151, V160, Q194, L221, Y227, R229, V230, A234, A282, D322, F327, A334, F338, y, en donde, después de su reemplazo, la identidad del residuo de aminoácido en la posición alineada según la numeración del receptor β -adrenérgico de pavo tal como se establece en la SEQ ID NO: 1 es la siguiente: 55A, 67A, 68L/Q/S, 89L, 90A/V, 98A, 129A/V/G, 151E/Q/R/T, 160A/L, 194A/S, 221I/V, 227A/F, 229A/Q, 230A, 234L/V/I, 282L/V/Q, 322A/P, 327A/L/V/G/M, 334L/S/V/I, 338A/I/L/V/M; o (ii) el mutante es un receptor de adenosina mutante que, en comparación con el correspondiente receptor de adenosina de tipo salvaje, tiene al menos el reemplazo de un aminoácido en una posición que, cuando se utilizan MacVector y CLUSTALW, se alinea en una o más de las siguientes posiciones según la numeración del receptor de adenosina A_{2a} humano tal como se establece en la SEQ ID NO: 5: G114, G118, L167, A184, R199, A203, L208, Q210, S213, E219, R220, S223, T224, Q226, K227, H230, L241, P260, S263, L267, L272, T279, N284, Q311, P313, K315, A54, V57, H75, T88, T119, K122, G123, P149, E151, G152, A204, A231, L235, V239, y, en donde, después de su reemplazo, la identidad del residuo de aminoácido en la posición alineada según la numeración del receptor de adenosina A_{2a} humano tal como se establece en la SEQ ID NO: 5 es la siguiente: 114A, 118A, 167A, 184L, 199A, 203L, 208A, 210A, 213A, 219A, 220A, 223A, 224A, 226A, 227A, 230A, 241A, 260A, 263A, 267A, 272A, 279A, 284A, 311A, 313A, 315A, 54L, 57A, 75A, 88A, 119A, 122A, 123A, 149A, 151A, 152A, 204L, 231L, 235A, 239A; o (iii) el mutante es un receptor de neurotensina mutante que, en comparación con el correspondiente receptor de neurotensina de tipo salvaje, tiene al menos el reemplazo de un aminoácido en una posición que, cuando se utilizan MacVector y CLUSTALW, se alinea en una o más de las siguientes posiciones según la numeración del receptor de neurotensina de rata tal como se establece en la SEQ ID NO: 9: A356, H103, D345, A86, A385, Y349, C386, K397, H393, I116, F358, S108, M181, R392, D113, G209, L205, L72, A120, P399, Y351, V268, T207, A155, S362, F189, N262, L109, W391, T179, S182, M293, L256, F147, D139, S100, K176, L111, A90, N270, A69, A73, V165, E166, G215, V229, M250, I253, A177, R183, I260, T279, T294, G306, L308, V309, L310, V313, F342, V360, N370, S373, F380, P389, G390, R395, y, en donde, después de su reemplazo, la identidad del residuo de aminoácido en la posición alineada según la numeración del receptor de neurotensina de rata tal como se establece en la SEQ ID NO: 9 es la siguiente: 356L, 103A, 345A, 86L, 385L, 349A, 386A, 397A, 393A, 116A, 358A, 108A, 181A, 392A, 113A, 209A, 205A, 72A, 120L, 399A, 351A, 268A, 207A, 155L, 362A, 189A, 262A, 109A, 391A, 179A, 182A, 293A, 256A, 147A, 139A, 100A, 176A, 111A, 90L, 270A, 69L, 73L, 165A, 166A, 215A, 229A, 250A, 253A, 177L, 183A, 260A, 279A, 294A, 306A, 308A, 309A, 310A, 313A, 342A, 360A, 370A, 373A, 380A, 389A, 390A, 395A; en donde cuando una sustancia diana se une a dicho GPCR mutante, se produce una señal detectable; y en donde la sustancia diana es un péptido, una proteína, un carbohidrato, un lípido, un ligando del GPCR, una molécula sintética, un fármaco, un metabolito del fármaco o un biomarcador de enfermedad.

Otras realizaciones del biosensor de la invención, así como los métodos para fabricarlos, se exponen en las reivindicaciones y la descripción.

- 55 La presente divulgación también proporciona un método para producir una pareja de unión de un GPCR que comprende:
- proporcionar un GPCR mutante de un GPCR parental, en donde el GPCR mutante tiene una estabilidad aumentada en una conformación particular en relación con el GPCR parental;
 - proporcionar uno o más compuestos de ensayo;
 - determinar si el o cada compuesto de ensayo se une al GPCR mutante cuando reside en la conformación particular; y

- d) aislar los compuestos de ensayo que se unen al GPCR mutante cuando residen en la conformación particular.

Por "pareja de unión" nos referimos a una molécula que se une a un GPCR en particular. Preferiblemente, la molécula se une selectivamente al GPCR. Por ejemplo, se prefiere que la pareja de unión tenga un valor de K_d (constante de disociación) que sea al menos cinco o diez veces menor (es decir, mayor afinidad) que para al menos otro GPCR, y preferiblemente más de 100 o 500 veces menor. Más preferiblemente, la pareja de unión de un GPCR tiene un valor de K_d más de 1.000 o 5.000 veces menor que para al menos otro GPCR. Sin embargo, se apreciará que los límites variarán dependiendo de la naturaleza de la pareja de unión. Por lo tanto, típicamente, para las parejas de unión que son moléculas pequeñas, la pareja de unión tiene típicamente un valor de K_d que es al menos 50 veces o 100 veces menor que para al menos otro GPCR. Típicamente, para las parejas de unión que son anticuerpos, la pareja de unión tiene típicamente un valor de K_d que es al menos 500 veces o 1.000 veces menor que para al menos otro GPCR.

El uso de GPCR estabilizados atrapados en conformaciones particulares aumentará la probabilidad de producir parejas de unión específicas de conformación. Por consiguiente, se aprecia que el método puede usarse para producir una pareja de unión específica de conformación de un GPCR. Por lo tanto, el método también se puede usar para identificar parejas de unión que tengan actividad funcional, como agonistas o antagonistas (u otras categorías farmacológicas), que se determinarán por la conformación en la que se estabilizó el GPCR.

Por "específica de conformación", queremos decir que la pareja de unión del GPCR se une selectivamente a una conformación particular del GPCR y, por lo tanto, tiene un valor de K_d para esa conformación que es menor que para otras conformaciones del mismo GPCR. Por lo tanto, una pareja de unión específica de conformación se unirá a una conformación de un GPCR (y puede hacer que el GPCR adopte esta conformación), pero no se une tan fuertemente a otra conformación que el GPCR pueda adoptar. Por lo tanto, se apreciará que, si bien la diferencia de afinidad entre dos conformaciones y la pareja de unión específica de conformación puede ser pequeña, típicamente será suficiente para alterar el equilibrio entre los estados conformacionales y alentar que el GPCR adopte una conformación particular. Por lo tanto, se puede considerar que una pareja de unión específica conformacional es aquella que atrapa un GPCR en una conformación de relevancia biológica (por ejemplo, un estado unido al ligando). Típicamente, una pareja de unión específica de conformación tiene un valor de K_d (constante de disociación) que es al menos cinco o diez veces menor (es decir, mayor afinidad) que para al menos otra conformación de la conformación de GPCR, y preferiblemente entre 100-10.000 veces menor.

Típicamente, la pareja de unión específica conformacional se une al GPCR con una K_d de mM a pM o de mM a fM, tal como en el rango de μM a nM o en el rango de nM a pM.

Los valores de K_d se pueden determinar fácilmente usando métodos bien conocidos en la técnica y tal como se describe, por ejemplo, a continuación.

$$\text{En equilibrio } K_d = [R][L]/[RL]$$

donde los términos entre corchetes representan la concentración de

- complejos receptor-ligando [RL],
- receptor no unido [R], y
- ligando no unido ("libre") [L].

Con el fin de determinar la K_d , se debe conocer el valor de estos términos. Dado que la concentración del receptor no suele conocerse, se utiliza la ecuación de Hill-Langmuir donde

$$\text{Ocupación fraccionaria} = [L]/[L] + K_d$$

Entonces, con el fin de determinar experimentalmente una K_d , se debe conocer la concentración del ligando libre y el ligando unido en el equilibrio. Típicamente, esto se puede hacer usando un ligando radiomarcado o marcado con fluorescencia que se incuba con el receptor (presente en células enteras o membranas homogeneizadas) hasta que se alcanza el equilibrio. La cantidad de ligando libre frente al ligando unido debe determinarse entonces separando la señal del ligando unido frente al ligando libre. En el caso de un radioligando, esto se puede hacer mediante centrifugación o filtración para separar el ligando unido presente en células completas o membranas del ligando libre en solución. Alternativamente, se usa un ensayo de proximidad por centelleo. En este ensayo, el receptor (en las membranas) se une a una perla que contiene un centelleante y la señal solo se detecta por la proximidad del radioligando unido al receptor inmovilizado en la perla.

La constante de afinidad también se puede determinar en un ensayo funcional (K_B). En este caso, el receptor en una célula completa o membrana se activa mediante un ligando agonista y se mide una respuesta (por ejemplo, la movilización del calcio intracelular, la activación de la proteína G, el aumento o la disminución de la adenilato ciclase o AMPc, la activación de una vía de transducción de señales, como la vía de la MAP-quinasa, o la activación de la transcripción génica). La capacidad de un antagonista para inhibir la actividad agonista puede medirse y para un antagonista competitivo es igual a la constante de afinidad.

La estabilidad de los GPCR mutantes en un rango de detergentes, tensioactivos y tampones de solubilización permite su purificación fuera de su entorno de membrana normal. Por lo tanto, el GPCR se puede proporcionar en forma aislada, separado de antígenos no deseados, tales como los GPCR no diana, las proteínas asociadas a la membrana y otros componentes de la membrana, tales como lipoproteínas, apolipoproteínas, lípidos, lípidos de fosfoinositol y liposacáridos. Por lo tanto, el método puede permitir la selección de una pareja de unión de un GPCR en ausencia de dichos antígenos no deseados. Por lo tanto, se pueden producir parejas de unión que tengan una selectividad mejorada para un GPCR en comparación con otros componentes de la membrana.

No se espera que las mutaciones del GPCR parental que confieren estabilidad en una conformación particular afecten a la unión del GPCR parental que reside en una conformación particular a una pareja de unión particular. Sin embargo, se aprecia que una vez que se ha aislado una pareja de unión evaluando la unión a un GPCR mutante que reside en una conformación particular, también se puede evaluar la unión de esa pareja de unión al GPCR parental que reside en la misma conformación particular.

Por tanto, el método comprende, además:

- 15 (e) determinar si el o cada compuesto de ensayo se une al GPCR parental cuando reside en la conformación particular; y
- (f) aislar aquellos compuestos de ensayo que también se unen al GPCR parental cuando residen en la conformación particular.

Típicamente, la pareja de unión seleccionada se une al GPCR mutante cuando reside en una conformación particular con una potencia similar a su unión al GPCR parental cuando reside en la misma conformación particular. Típicamente, los valores de K_d para la pareja de unión particular que se une al GPCR mutante y al GPCR parental están dentro de 5-10 veces entre sí, tal como dentro de 2-3 veces. Típicamente, la unión de la pareja de unión al GPCR mutante en comparación con el GPCR parental no sería más de 5 veces más débil ni más de 10 veces más fuerte.

Típicamente, la pareja de unión seleccionada se une al GPCR mutante con una afinidad aproximadamente igual (es decir, típicamente dentro de 2-3 veces) o una afinidad mayor que la del receptor parental, cuando reside en la misma conformación. Para los mutantes de conformación agonista, los mutantes se unen típicamente a las parejas de unión específicas de la conformación agonista con la misma o mayor afinidad que el GPCR parental y típicamente se unen a las parejas de unión específicas de la conformación antagonista con la misma o menor afinidad que el GPCR parental. De manera similar para los mutantes de conformación antagonista, los mutantes se unen típicamente a las parejas de unión específicas de la conformación antagonista con la misma o mayor afinidad que el GPCR parental y típicamente se unen a las parejas de unión específicas de la conformación agonista con la misma o menor afinidad que el GPCR parental.

La selectividad de las parejas de unión para conformaciones particulares de GPCR o para GPCR particulares y el cálculo de las K_d pueden determinarse usando ensayos de unión bien conocidos en la técnica y tal como se describe, por ejemplo, a continuación. Típicamente, los valores de K_d se calculan usando ensayos de GPCR convencionales en membranas en donde se mide la afinidad de unión a diferentes concentraciones del compuesto. Los ejemplos de ensayos adecuados incluyen los ensayos de resonancia de plasmiones superficiales y los ensayos de competición que son bien conocidos en la técnica y se describen a continuación.

Típicamente, el GPCR mutante usado en el método de producción de una pareja de unión de un GPCR puede seleccionarse y prepararse usando cualquiera de los métodos que se describen a continuación.

40 **Proporcionar un GPCR mutante de un GPCR parental**

Se puede proporcionar un GPCR mutante con mayor estabilidad en relación con su GPCR parental mediante los métodos descritos a continuación y mediante cualquiera de los métodos divulgados en las solicitudes PCT WO 2008/114020 y PCT/GB2008/004032.

Método 1

- 45 Un método para seleccionar un receptor acoplado a proteína G (GPCR) mutante con mayor estabilidad, comprende
 - (a) proporcionar uno o más mutantes de un GPCR parental,
 - (b) seleccionar un ligando, siendo el ligando uno que se une al GPCR parental cuando el GPCR reside en una conformación particular,
 - (c) determinar si el o cada GPCR mutante tiene una mayor estabilidad con respecto a la unión al ligando seleccionado en comparación con la estabilidad del GPCR parental con respecto a la unión a ese ligando, y
 - (d) seleccionar aquellos mutantes que tienen una estabilidad aumentada en comparación con el GPCR parental con respecto a la unión del ligando seleccionado.

Los inventores han apreciado que, con el fin de mejorar la probabilidad de cristalización de un GPCR en una forma biológicamente relevante (que, por lo tanto, es farmacológicamente útil), es deseable no solo aumentar la estabilidad de la proteína, sino también que la proteína tenga esta mayor estabilidad cuando está en una conformación particular. La conformación está determinada por un ligando seleccionado, y es una conformación biológicamente relevante, en particular una conformación farmacológicamente relevante. Por lo tanto, el método de selección puede considerarse un método para seleccionar mutantes de un GPCR que tienen una mayor estabilidad de una conformación particular, por ejemplo, pueden tener una mayor termoestabilidad conformacional. El método puede usarse para crear GPCR estables y bloqueados conformacionalmente mediante mutagénesis. Los GPCR mutantes seleccionados son formas efectivamente más puras de las moléculas parentales, ya que una proporción mucho mayor de ellas ocupa un estado conformacional particular. La selección deliberada de una conformación de receptor elegida resuelta a partir de otras conformaciones mediante el uso de un ligando (o ligandos) que se unen preferentemente a esta conformación es, por lo tanto, una característica importante del método de selección. El método también puede considerarse un método para seleccionar GPCR mutantes que son más fáciles de tratar hasta la cristalización. Esto se debe a que es bien sabido que la disminución de la homogeneidad o el aumento de la pleiotropía dentro de una población de moléculas no favorecen la cristalización y, además, que un mayor número de conformaciones de una molécula particular no favorece la cristalización.

Por tanto, un método adicional para seleccionar un receptor acoplado a proteína G (GPCR) mutante con mayor estabilidad, comprende

- (a) proporcionar uno o más mutantes de un GPCR parental,
- (b) seleccionar un ligando, siendo el ligando uno que se une al GPCR parental cuando el GPCR reside en una conformación particular,
- (c) determinar si el o cada GPCR mutante, cuando residen en la conformación particular, tienen una mayor estabilidad con respecto a la unión al ligando seleccionado en comparación con la estabilidad del GPCR parental cuando reside en la misma conformación particular con respecto a la unión a ese ligando, y
- (d) seleccionar aquellos mutantes que tienen una estabilidad aumentada en comparación con el GPCR parental con respecto a la unión del ligando seleccionado.

En una revisión del genoma susceptible a modulación por fármacos por Hopkins y Groom (2002) *Nature Rev. Drug Discovery* 1, 727-730, la Tabla 1 contiene una lista de familias de proteínas, muchas de las cuales son GPCR. Overington *et al* (2006) *Nature Rev. Drug Discovery* 5, 993-996 proporcionan más detalles sobre las dianas de los fármacos, y la Figura 1 indica que más de una cuarta parte de los fármacos actuales se dirigen a los GPCR. Hay 52 dianas de GPCR para los fármacos disponibles por vía oral de un total de 186 dianas totales en esta categoría.

Los GPCR adecuados para su uso en la práctica de la invención incluyen el receptor β -adrenérgico, el receptor de adenosina, en particular el receptor de adenosina A_{2a} y el receptor de neurotensina (NTR). Otros GPCR adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen los enumerados en Hopkins y Groom *supra*. Además, la Unión Internacional de Farmacología elabora una lista de GPCR (Foord *et al* (2005) *Pharmacol. Rev.* 57, 279-288 y esta lista se actualiza periódicamente en <http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorFamiliesForward>). Se observará que los GPCR se dividen en diferentes clases, basándose principalmente en sus similitudes en las secuencias de aminoácidos. También se dividen en familias por referencia a los ligandos naturales a los que se unen.

Las secuencias de aminoácidos (y las secuencias de nucleótidos de los ADNc que las codifican) de muchos GPCR están fácilmente disponibles, por ejemplo, por referencia a GenBank. En particular, Foord *et al supra*, proporcionan los símbolos de los genes humanos y las ID de los genes humanos, de ratones y ratas de Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). Debe observarse, también, que debido a que la secuencia del genoma humano está sustancialmente completa, las secuencias de aminoácidos de los GPCR humanos pueden deducirse de la misma.

Para evitar dudas, incluimos en el significado de "derivado de" que un ADNc o gen se obtuvo originalmente utilizando material genético de la fuente, pero que la proteína puede expresarse en cualquier célula huésped posteriormente. Por lo tanto, quedará claro que un GPCR eucariota (tal como un GPCR aviar o de mamífero) puede expresarse en una célula huésped procarionta, tal como *E. coli*, pero debe considerarse de origen aviar o mamífero, según sea el caso.

En algunos casos, el GPCR puede estar compuesto por más de una subunidad diferente. Por ejemplo, el receptor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina requiere la unión de una única proteína de hélice transmembrana (RAMP1) para adquirir sus características fisiológicas de unión al ligando. Las proteínas efectoras, accesorias, auxiliares o que interactúan con el GPCR que se combinan con el GPCR para formar o modular un complejo funcional son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, quinasas de receptor, proteínas G y arrestinas (Bockaert *et al* (2004) *Curr Opinion Drug Discov and Dev* 7, 649-657).

Los mutantes del GPCR parental pueden producirse de cualquier manera adecuada y proporcionarse en cualquier forma adecuada. Así, por ejemplo, se puede producir una serie de mutantes específicos de la proteína parental en la que cada residuo de aminoácido en la totalidad o una parte de la proteína parental se cambia independientemente a otro residuo de aminoácido. Por ejemplo, puede ser conveniente realizar mutaciones en aquellas partes de la proteína

- que se prevé que atravesen la membrana. La estructura tridimensional de la rodopsina es conocida (Li *et al* (2004) *J Mol Biol* **343**, 1409-1438; Palczewski *et al* (2000) *Science* **289**, 739-745), y es posible modelar ciertos GPCR usando esta estructura. Por lo tanto, convenientemente, las partes del GPCR que se van a mutar pueden basarse en el modelado. De manera similar, se encuentran disponibles programas informáticos que modelan las regiones transmembrana de los GPCR basándose en la hidrofobicidad (Kyle y Dolittle (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132), y se pueden utilizar dichos modelos al seleccionar las partes de la proteína que se van a mutar. Se puede emplear la mutagénesis dirigida al sitio convencional, o se pueden usar procedimientos basados en la reacción en cadena de la polimerasa bien conocidos en la técnica. Es posible, pero menos deseable, usar métodos de presentación en ribosomas en la selección de la proteína mutante.
- 5 Típicamente, cada aminoácido seleccionado se reemplaza por Ala (es decir, mutagénesis por barrido de Ala), aunque puede reemplazarse por cualquier otro aminoácido. Si el aminoácido seleccionado es Ala, puede reemplazarse convenientemente por Leu. Alternativamente, el aminoácido puede reemplazarse por Gly (es decir, mutagénesis por barrido de Gly), lo que puede permitir un empaquetamiento más estrecho de las hélices vecinas que pueden bloquear la proteína en una conformación particular. Si el aminoácido seleccionado es Gly, puede reemplazarse convenientemente por Ala.
- 10 Aunque el aminoácido usado para reemplazar el aminoácido dado en una posición particular es típicamente un aminoácido de origen natural, típicamente un aminoácido "codificable", puede ser un aminoácido no natural (en cuyo caso la proteína se produce típicamente mediante síntesis química o mediante el uso de amino-acil ARNt no naturales). Un aminoácido "codificable" es uno que se incorpora en un polipéptido mediante la traducción del ARNm. También es 15 posible crear aminoácidos no naturales o introducir enlaces no peptídicos en una posición dada mediante modificación química covalente, por ejemplo, mediante tratamiento postraduccional de la proteína o semisíntesis. Estas modificaciones postraduccionales pueden ser naturales, tales como fosforilación, glicosilación o palmitoilación, o sintéticas o biosintéticas.
- 20 Convenientemente, el GPCR mutante tiene un aminoácido reemplazado en comparación con la proteína parental (es decir, está mutado en una posición de aminoácido). De esta manera, se puede evaluar la contribución a la estabilidad de un único reemplazo de aminoácido. Sin embargo, el GPCR mutante sometido a ensayo para determinar la estabilidad puede tener más de un aminoácido reemplazado en comparación con la proteína parental, tal como 2 o 3 o 4 o 5 o 6 reemplazos.
- 25 Como se analiza con más detalle a continuación, se pueden realizar combinaciones de mutaciones basándose en los resultados del método de selección. Se ha descubierto que, en algunos casos específicos, la combinación de mutaciones en una única proteína mutante conduce a un aumento adicional de la estabilidad. Por lo tanto, se apreciará que el método de selección se puede usar de forma iterativa, por ejemplo, llevándolo a cabo para identificar mutaciones individuales que aumentan la estabilidad, combinando esas mutaciones en un solo GPCR mutante que es el GPCR 30 que se proporciona entonces en la parte (a) del método. Por lo tanto, las proteínas mutantes de manera múltiple se 35 pueden seleccionar usando el método.
- El GPCR parental es un GPCR humano de tipo salvaje.
- Se apreciará que la estabilidad del mutante debe compararse con la de un parental con el fin de evaluar un aumento en la estabilidad.
- 40 Se selecciona un ligando, siendo el ligando uno que se une al GPCR parental cuando reside en una conformación particular. Típicamente, el ligando se unirá a una conformación del GPCR parental (y puede hacer que el GPCR adopte esta conformación), pero no se une tan fuertemente a otra conformación que el GPCR pueda adoptar. Por lo tanto, se 45 puede considerar que la presencia del ligando estimula que el GPCR adopte la conformación particular. Por lo tanto, se puede considerar que el método es una forma de seleccionar los GPCR mutantes que están atrapados en una conformación de relevancia biológica (por ejemplo, un estado unido al ligando) y que son más estables con respecto a esa conformación.
- Preferiblemente, la conformación particular en la que reside el GPCR en la etapa (c) corresponde a la clase de ligando seleccionada en la etapa (b).
- 50 Preferiblemente, el ligando seleccionado es de la clase de ligandos agonistas y la conformación particular es una conformación agonista, o el ligando seleccionado es de la clase de ligandos antagonistas y la conformación particular es una conformación antagonista.
- 55 Preferiblemente, el ligando seleccionado es de la clase de ligandos agonistas y la conformación particular en la que reside el GPCR en la etapa (c) es la conformación agonista.
- Preferiblemente, la afinidad de unión del ligando seleccionado para el receptor mutante debe ser igual o mayor que la del receptor de tipo salvaje; los mutantes que muestran una unión significativamente reducida al ligando seleccionado son rechazados típicamente.
- Por "ligando" incluimos cualquier molécula que se une al GPCR y que hace que el GPCR resida en una conformación

particular. El ligando es preferiblemente uno que hace que más de la mitad de las moléculas de GPCR en general estén en una conformación particular.

Se conocen muchos ligandos adecuados.

Típicamente, el ligando es un agonista total y es capaz de unirse al GPCR y es capaz de provocar una respuesta biológica completa (100 %), medida, por ejemplo, mediante el acoplamiento de la proteína G, los eventos de señalización aguas abajo o un resultado fisiológico tal como la vasodilatación. Por lo tanto, típicamente, la respuesta biológica es el intercambio de GDP/GTP en una proteína G, seguido de la estimulación de la vía efectora ligada. La medición, típicamente, es el intercambio de GDP/GTP o un cambio en el nivel del producto final de la ruta (por ejemplo, AMPc, GMPc o fosfatos de inositol). El ligando también puede ser un agonista parcial y es capaz de unirse al GPCR y es capaz de provocar una respuesta biológica parcial (<100 %).

El ligando también puede ser un agonista inverso, que es una molécula que se une a un receptor y reduce su actividad basal (es decir, no estimulada por el agonista) a veces incluso a cero.

El ligando también puede ser un antagonista, que es una molécula que se une a un receptor y bloquea la unión de un agonista, impidiendo así una respuesta biológica. Los agonistas inversos y los agonistas parciales pueden ser antagonistas en determinadas condiciones de ensayo.

Los ligandos anteriores pueden ser ortostéricos, con lo que incluimos el significado de que se combinan con el mismo sitio que el agonista endógeno; o pueden ser allostéricos o alotópicos, con lo que incluimos el significado de que se combinan con un sitio distinto del sitio ortostérico. Los ligandos anteriores pueden ser sintópicos, con lo que incluimos el significado de que interactúan con otro(s) ligando(s) en el mismo sitio o en un sitio superpuesto. Pueden ser reversibles o irreversibles.

En relación con los antagonistas, pueden ser superables, con lo que incluimos el significado de que el efecto máximo del agonista no se reduce ni con el tratamiento previo ni con el tratamiento simultáneo con el antagonista; o pueden ser insuperables, con lo que incluimos el significado de que el efecto máximo del agonista se reduce mediante el tratamiento previo o el tratamiento simultáneo con el antagonista; o pueden ser neutrales, con lo que incluimos el significado de que el antagonista es uno sin actividad de agonista inverso o agonista parcial. Los antagonistas también son típicamente agonistas inversos.

Los ligandos usados en el método de selección también pueden ser moduladores allostéricos tales como moduladores allostéricos positivos, potenciadores, moduladores allostéricos negativos e inhibidores. Pueden tener actividad como agonistas o agonistas inversos por derecho propio o pueden tener actividad solo en presencia de un agonista o agonista inverso, en cuyo caso se usan en combinación con dichas moléculas con el fin de unirse al GPCR.

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

Los ligandos mencionados anteriormente pueden ser pequeños restos orgánicos o inorgánicos, pero pueden ser péptidos o polipéptidos. Típicamente, cuando el ligando es un resto orgánico u orgánico pequeño, tiene un Mr de 50 a 2.000, tal como de 100 a 1.000, por ejemplo, de 100 a 500.

Típicamente, el ligando se une al GPCR con una K_d de mM a pM, tal como en el rango de μM (micromolar) a nM. En general, se prefieren los ligandos con la K_d más baja.

Los ligandos que son moléculas orgánicas pequeñas son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, véanse los Ejemplos siguientes. Otros ligandos que son moléculas pequeñas incluyen 5HT, que es un agonista total del receptor 5HT1A; eltoprazina, que es un agonista parcial del receptor 5HT1A (véase Newman-Tancredi *et al* (1997) *Neuropharmacology* **36**, 451-459); (+)-butaclamol y espiperona son agonistas inversos del receptor D2 de la dopamina (véase Roberts y Strange (2005) *Br. J. Pharmacol.* **145**, 34-42); y el WIN55212-3 es un antagonista neutro del CB2 (Savinainen *et al* (2005) *Br. J. Pharmacol.* **145**, 636-645).

El ligando puede ser un peptidomimético, un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico (PNA) o un aptámero. Puede ser un ion como Na^+ o Zn^{2+} , un lípido como la oleamida o un carbohidrato como la heparina.

El ligando puede ser un polipéptido que se une al GPCR. Dichos polipéptidos (entre los que se incluyen los oligopéptidos) son típicamente de Mr 500 a Mr 50.000, pero pueden ser más grandes. El polipéptido puede ser una proteína natural que interactúa con el GPCR u otra proteína que interactúa con el GPCR, o un derivado o fragmento de la misma, siempre que se une selectivamente al GPCR en una conformación particular. Las proteínas que interactúan con el GPCR incluyen las asociadas con la señalización y las asociadas con el tráfico, que a menudo actúan a través de los dominios PDZ en la parte C terminal del GPCR.

Los polipéptidos que se sabe que se unen a ciertos GPCR incluyen cualquiera de una proteína G, una arrestina, una proteína RGS, una quinasa de receptor de proteína G, una RAMP, una proteína 14-3-3, una NSF, una periplacina, una espinofilina, una cinasa GPCR, una tirosina quinasa de receptor, un canal iónico o subunidad del mismo, una anquirina y una proteína de Shanks u Homer. Otros polipéptidos incluyen las subunidades NR1 o NR2a del receptor de NMDA,

el calcyon o un marco de dominio de fibronectina. El polipéptido puede ser uno que se une a un dominio extracelular de un GPCR, tal como fibulina-1. El polipéptido puede ser otro GPCR, que se une al GPCR seleccionado en un hetero-olígómero. Se encuentra una revisión de las interacciones proteína-proteína en los GPCR en Milligan y White (2001) *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 513-518, o en Bockaert *et al* (2004) *Curr. Opinion Drug Discov. Dev.* **7**, 649-657.

- 5 El ligando polipeptídico puede ser convenientemente un anticuerpo que se une al GPCR. Por el término "anticuerpo" incluimos una inmunoglobulina ya sea natural o producida parcial o totalmente sintéticamente. Los ejemplos incluyen isotipos de inmunoglobulinas y sus subclases isotípicas, y anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos que comprenden dominios de unión a antígeno tales como Fab, F(ab')2, Fv monocatenario (scFv), Fv, anticuerpos de dominio (dAb) y diacuerpos. También se mencionan los anticuerpos de camélidos y los anticuerpos de camélidos modificados por ingeniería. Dichas moléculas que se unen a los GPCR son conocidas en la técnica y, en cualquier caso, se pueden preparar usando tecnología bien conocida. Los anticuerpos adecuados incluyen los que se usan actualmente en el radioinmunoensayo (RIA) para los GPCR, ya que tienden a reconocer epítopos conformacionales.

10 El polipéptido también puede ser una proteína de unión basada en un marco modular, tales como proteínas de repetición de anquirina, proteínas de repetición de armadillo, proteínas ricas en leucina, proteínas de repetición de tetratripéptidos o proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin) o proteínas basadas en dominios de lipocalina o fibronectina o andamios de afilina basados en cristalina gamma humana o ubiquitina humana.

15 El ligando puede unirse covalentemente al GPCR, tal como una proteína G o una proteína de fusión de arrestina. Algunos GPCR (por ejemplo, el receptor de trombina) son escindidos en el extremo N por una proteasa y el nuevo extremo N se une al sitio agonista. Por lo tanto, dichos GPCR son fusiones naturales de GPCR-ligando.

- 20 Se apreciará que el uso de anticuerpos, u otros polipéptidos de unión "universales" (tales como las proteínas G, que se sabe que se acoplan con muchos GPCR diferentes) puede ser particularmente ventajoso en el uso del método en GPCR "huérfanos" para los que no se conocen el ligando natural ni los ligandos que son moléculas pequeñas.

25 Una vez que se ha seleccionado el ligando, se determina entonces si el o cada GPCR mutante tiene una mayor estabilidad con respecto a la unión al ligando seleccionado en comparación con el GPCR parental con respecto a la unión a ese ligando. Se apreciará que esta etapa (c) es una en la que se determina si el o cada GPCR mutante tiene una mayor estabilidad (en comparación con su parental) para la conformación particular que está determinada por el ligando seleccionado. Por lo tanto, el GPCR mutante tiene una mayor estabilidad con respecto a la unión al ligando seleccionado, medida por la unión del ligando o mientras se une al ligando seleccionado. Como se discute más adelante, se prefiere particularmente que el aumento de la estabilidad se evalúe mientras se une al ligando seleccionado.

- 30 El aumento de la estabilidad se mide convenientemente mediante una vida útil prolongada del mutante en las condiciones impuestas que pueden conducir a la inestabilidad (tales como calor, condiciones de detergente severas, agentes caotrópicos, etc.). La desestabilización en la condición impuesta se determina típicamente midiendo la desnaturalización o la pérdida de estructura. Como se describe más adelante, esto puede manifestarse en sí mismo por la pérdida de la capacidad de unión al ligando o la pérdida de los indicadores de estructura secundaria o terciaria.

35 Como se describe con respecto a la Figura 12 a continuación (que representa una realización preferida particular), existen diferentes formatos de ensayo que pueden usarse para determinar la estabilidad del GPCR mutante.

En una realización, el GPCR mutante puede ponerse en contacto con un ligando antes de someterlo a un procedimiento en el que se determina la estabilidad del mutante (el GPCR mutante y el ligando permanecen en contacto durante el período de ensayo). Así, por ejemplo, cuando el método se usa para seleccionar GPCR mutantes que en una conformación se unen a un ligando y que tienen una termoestabilidad mejorada, el receptor se pone en contacto con el ligando antes de calentarse y, a continuación, la cantidad de ligando unido al receptor después del calentamiento puede usarse para expresar la termoestabilidad en comparación con el receptor parental. Esto proporciona una medida de la cantidad de GPCR que retiene la capacidad de unión al ligando después de la exposición a las condiciones desnaturalizantes (por ejemplo, calor), lo que a su vez es un indicador de estabilidad.

45 El GPCR mutante puede someterse alternativamente a un procedimiento en el que se determina la estabilidad del mutante antes de ponerse en contacto con el ligando. Así, por ejemplo, cuando el método se usa para seleccionar receptores de membrana mutantes que, en una conformación se unen a un ligando y que tienen una termoestabilidad mejorada, el receptor se calienta en primer lugar, antes de ponerse en contacto con el ligando y la cantidad de ligando unido al receptor puede usarse para expresar la termoestabilidad. De nuevo, esto proporciona una medida de la cantidad de GPCR que retiene la capacidad de unión al ligando después de la exposición a las condiciones desnaturalizantes.

50 En ambos casos, se apreciará que la comparación de la estabilidad del mutante se hace por referencia a la molécula parental en las mismas condiciones.

55 Se apreciará que, en ambos casos, los mutantes que se seleccionan son aquellos que tienen una mayor estabilidad cuando residen en la conformación particular en comparación con la proteína parental.

La ruta preferida puede depender del GPCR específico y dependerá del número de conformaciones accesibles a la

proteína en ausencia de ligando. En la Figura 12, se prefiere que el ligando esté presente durante la etapa de calentamiento porque esto aumenta la probabilidad de que se seleccione la conformación deseada.

A partir de lo anterior, se apreciará que el método de selección incluye un método para seleccionar un GPCR mutante con una termoestabilidad aumentada, comprendiendo el método (a) proporcionar uno o más mutantes de un GPCR parental, (b) seleccionar un antagonista o un agonista que se une al GPCR parental, (c) determinar si el o cada mutante tiene una mayor termoestabilidad cuando está en presencia de dicho antagonista o agonista midiendo la capacidad del GPCR mutante para unirse a dicho antagonista o agonista seleccionado a una temperatura particular y después de un tiempo particular en comparación con el GPCR parental y (d) seleccionar aquellos GPCR mutantes que se unen más a dicho antagonista o agonista seleccionado a la temperatura particular y después del tiempo particular que el GPCR parental en las mismas condiciones. En la etapa (c), se usa típicamente un período de tiempo fijo a la temperatura particular para medir la capacidad del GPCR mutante para unirse a dicho antagonista o agonista seleccionado. En la etapa (c), se eligen típicamente una temperatura y un tiempo en los que la unión de dicho antagonista o agonista seleccionado por el GPCR parental se reduce en un 50 % durante el período de tiempo fijo a esa temperatura (lo que es indicativo de que el 50 % del receptor está inactivado; "cuasi" Tm).

Convenientemente, cuando el ligando se usa para ensayar el GPCR (es decir, se usa para determinar si está en un estado no desnaturalizado), el ligando se marca de forma detectable, por ejemplo, se marca radiactivamente o se marca con fluorescencia. La unión del ligando se puede evaluar midiendo la cantidad de ligando no unido usando un sistema de detección secundario, por ejemplo, un anticuerpo u otra pareja de unión de alta afinidad unido covalentemente a un resto detectable, por ejemplo, una enzima que puede usarse en un ensayo colorimétrico (tal como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano picante). También se puede usar la metodología FRET. Se apreciará que el ligando usado para ensayar el GPCR mutante para determinar su estabilidad no necesita ser el mismo ligando que el seleccionado en la etapa (b) del método.

Aunque es conveniente medir la estabilidad del GPCR parental y mutante usando la capacidad de unirse a un ligando como indicador de la presencia de una proteína no desnaturalizada, se conocen otros métodos en la técnica. Por ejemplo, los cambios en los espectros de fluorescencia pueden ser un indicador sensible del despliegado, ya sea mediante el uso de la fluorescencia intrínseca del triptófano o el uso de sondas fluorescentes extrínsecas tales como 1-anilino-8-naftalenosulfonato (ANS), por ejemplo, tal como se implementa en el método ThermoFluor™ (Mezzasalma et al, J Biomol Screening, 2007, abril; 12 (3):418-428). La estabilidad proteolítica, el intercambio de deuterio/hidrógeno medido mediante espectrometría de masas, los geles nativos azules, la electroforesis de la zona capilar, los espectros de dicroísmo circular (CD) y la dispersión de la luz también se pueden usar para medir el despliegue por la pérdida de señales asociadas con la estructura secundaria o terciaria. Sin embargo, todos estos métodos requieren que la proteína se purifique en cantidades razonables antes de que puedan usarse (por ejemplo, cantidades altas de pmol/nmol), mientras que el método descrito en los Ejemplos utiliza cantidades de pmoles de GPCR esencialmente no purificado.

En un caso de la divulgación, en la etapa (b), se seleccionan dos o más ligandos de la misma clase, y la presencia de cada uno hace que el GPCR resida en la misma conformación particular. Por lo tanto, se pueden usar uno o más ligandos (ya sean naturales o no naturales) de la misma clase (por ejemplo, agonista total o agonista parcial o antagonista o agonista inverso). La inclusión de múltiples ligandos de la misma clase en este proceso, ya sea en serie o en paralelo, minimiza el riesgo teórico de diseñar y seleccionar inadvertidamente conformaciones de receptores con múltiples mutaciones sustancialmente diferentes a las parentales, por ejemplo, en su sitio de unión, pero que aún puedan, debido a los cambios compensatorios, unirse al ligando. Se pueden seguir las siguientes etapas para mitigar este riesgo:

1. Seleccionar un conjunto químicamente distinto (por ejemplo, n = 2-5) de ligandos, en una clase farmacológica común, como lo demuestra, por ejemplo, un ensayo de unión o funcional o espectroscópico. Debe pensarse que estos ligandos se unen a una región espacial común del receptor, como lo demuestran, por ejemplo, los estudios de unión competitiva que utilizan receptores de tipo salvaje y/o mutados, y/o mediante el modelado molecular, aunque no expresarán necesariamente un farmacóforo común.
2. Preparar mutantes de receptores únicos o múltiples destinados a aumentar la estabilidad y ensayar la unión estrecha utilizando el conjunto completo de ligandos. Los ensayos se pueden parallelizar, multiplexar o ejecutar en serie.
3. Confirmar la autenticidad del mutante del receptor estabilizado midiendo, por ejemplo, la isoterma de unión para cada ligando y midiendo el cambio de estabilidad con el ligando (la ventana debería reducirse típicamente en comparación con el tipo salvaje).

Con el fin de evitar los cambios en la afinidad aparente causados por perturbaciones en el sitio de unión tras la mutación, se deben usar preferiblemente ligandos de la misma clase farmacológica, pero de una clase química diferente, para perfilar el receptor. Típicamente, estos deberían mostrar cambios de afinidad similares (mutantes frente a parental, por ejemplo, de tipo salvaje) a pesar de tener diferentes propiedades de reconocimiento molecular. Los experimentos de unión deben realizarse preferiblemente usando un ligando marcado dentro de la misma clase farmacológica.

No obstante, debe reconocerse que pueden existir sustratos conformacionales que son específicos para las clases químicas de ligandos dentro de la misma clase farmacológica, y estos pueden estabilizarse específicamente en el procedimiento dependiendo de la clase química del ligando seleccionado.

- 5 Típicamente, el ligando seleccionado se une al GPCR mutante con una potencia similar a su unión al GPCR parental.
 5 Típicamente, los valores de K_d para la unión del ligando particular al GPCR mutante y al GPCR parental están dentro de 5-10 veces entre sí, tal como dentro de 2-3 veces. Típicamente, la unión del ligando al GPCR mutante en comparación con el GPCR parental no sería más de 5 veces más débil ni más de 10 veces más fuerte.
- 10 Típicamente, los receptores mutantes que se han estabilizado en la conformación seleccionada deberían unirse al ligando seleccionado con una afinidad aproximadamente igual (es decir, típicamente dentro de 2-3 veces) o una afinidad mayor que la del receptor parental. Para los mutantes con conformación agonista, los mutantes típicamente se unen a los agonistas con la misma o mayor afinidad que el GPCR parental y típicamente se unen a los antagonistas con la misma o menor afinidad que el GPCR parental. De manera similar, para los mutantes con conformación agonista, los mutantes típicamente se unen a los antagonistas con la misma o mayor afinidad que el GPCR parental y típicamente se unen a los agonistas con la misma o menor afinidad que el GPCR parental.
- 15 Los mutantes que muestran una reducción significativa (típicamente superior a 2-3 veces) en la afinidad por el ligando seleccionado típicamente se rechazan.
- Típicamente, el orden jerárquico de unión de un conjunto de ligandos de la misma clase es comparable, aunque puede haber una o dos inversiones en el orden, o puede haber un valor atípico en el conjunto.
- 20 En un caso adicional, se pueden usar dos o más ligandos que se unen simultáneamente al receptor en la misma conformación, por ejemplo, un modulador alostérico y un agonista ortostérico.
- Para evitar dudas, y como resulta evidente a partir de los Ejemplos, no es necesario usar múltiples ligandos para que el método efectivo.
- 25 En un caso adicional, puede ser ventajoso seleccionar aquellos GPCR mutantes que, aun siendo capaces de unirse al ligando seleccionado, no son capaces de unirse, o se unen con menos fuerza que el GPCR parental, a un segundo ligando seleccionado que está en una clase diferente al primer ligando. Así, por ejemplo, el GPCR mutante puede ser uno que se selecciona sobre la base de que tiene una mayor estabilidad con respecto a la unión a un antagonista seleccionado, pero el GPCR mutante así seleccionado se ensaya adicionalmente para determinar si se une a un agonista completo (o se une con menos fuerza a un agonista completo que su GPCR parental). Se seleccionan mutantes que no se unen (o tienen una unión reducida) al agonista completo. De esta manera, se realiza una selección adicional de un GPCR que está bloqueado en una conformación particular.
- 30 Se apreciará que el ligando seleccionado (con respecto a la parte (b) del método) y el (segundo) ligando adicional, tal como se ha discutido anteriormente, pueden ser cualquier par de clases de ligandos, por ejemplo: antagonista y agonista completo; agonista completo y antagonista; antagonista y agonista inverso; agonista y antagonista inverso; agonista inverso y agonista completo; agonista completo y agonista inverso; y así sucesivamente.
- 35 Se prefiere que el receptor mutante se una al (segundo) ligando adicional con una afinidad que sea inferior al 50 % de la afinidad que el receptor parental tiene por el mismo (segundo) ligando adicional, más preferiblemente inferior al 10 % y aún más preferiblemente inferior al 1 % o 0,1 % o 0,01 % de afinidad por el receptor parental. Por lo tanto, la K_d para la interacción del segundo ligando con el receptor mutante es mayor que para el receptor parental. Como se muestra en el Ejemplo 1, el receptor β -adrenérgico mutante β AR-m23 (que se seleccionó mediante el método de selección 40 utilizando un antagonista) se une a un agonista 3 órdenes de magnitud más débilmente que su parental (es decir, la K_d es 1.000 x más alta). De manera similar, en el Ejemplo 2, el receptor de adenosina A_{2a} mutante Rant21 se une al agonista de 2-4 órdenes de magnitud más débilmente que su parental.
- Este tipo de contraselección es útil porque puede usarse para dirigir el procedimiento de mutagénesis de manera más específica (y por lo tanto más rápidamente y más eficientemente) a lo largo de una ruta hacia una conformación pura tal como la define el ligando.
- 45 Preferiblemente, el GPCR mutante se proporciona en una forma solubilizada adecuada en la que mantiene la integridad estructural y está en una forma funcional (por ejemplo, es capaz de unirse al ligando). Se usa un sistema solubilizante apropiado, tal como un detergente adecuado (u otro agente anfipático) y un sistema tampón, que el experto en la técnica puede elegir para que sea efectivo para la proteína en particular. Los detergentes típicos que pueden usarse incluyen, por ejemplo, dodecilmaltósido (DDM) o CHAPS u octilglucósido (OG) o muchos otros. Puede ser conveniente incluir otros compuestos tales como hemisuccinato de colesterol o el propio colesterol o heptano-1,2,3-triol. La presencia de glicerol o prolina o betaína puede ser útil. Es importante que el GPCR, una vez solubilizado a partir de la membrana en la que reside, sea lo suficientemente estable como para ensayarse. Para algunos GPCR, el DDM será suficiente, pero se puede añadir glicerol u otros polioles para aumentar la estabilidad con fines de ensayo, si se desea. Se puede lograr una mayor estabilidad para los fines del ensayo, por ejemplo, solubilizando en una mezcla de DDM, CHAPS y hemisuccinato de colesterol, opcionalmente en presencia de glicerol. Para los GPCR particularmente inestables, puede ser deseable solubilizarlos usando digitonina o anfipoles u otros polímeros que puedan solubilizar los

GPCR directamente de la membrana, en ausencia de detergentes tradicionales, y mantener la estabilidad, típicamente permitiendo que un número significativo de lípidos permanezca asociado con el GPCR. Los nanodiscos también se pueden usar para solubilizar proteínas de membrana extremadamente inestables en una forma funcional.

5 Típicamente, el GPCR mutante se proporciona en un extracto bruto (por ejemplo, de la fracción de membrana de la célula huésped en la que se ha expresado, tal como *E. coli*). Puede proporcionarse en una forma en la que la proteína mutante comprenda típicamente al menos el 75 %, más típicamente al menos el 80 % o el 85 % o el 90 % o el 95 % o el 98 % o el 99 % de la proteína presente en la muestra. Por supuesto, típicamente se solubiliza como se ha discutido anteriormente, y así el GPCR mutante se asocia normalmente con moléculas de detergente y/o moléculas de lípidos.

10 Se puede seleccionar un GPCR mutante que tenga una mayor estabilidad frente a cualquier condición de desnaturalización o desnaturalizante, tal como frente a una o más de calor, detergente, agente caotrópico o un pH extremo.

15 En relación con una mayor estabilidad al calor (es decir, termoestabilidad), esto se puede determinar fácilmente midiendo la unión del ligando o usando métodos espectroscópicos como fluorescencia, CD o dispersión de la luz a una temperatura particular. Típicamente, cuando el GPCR se une a un ligando, la capacidad del GPCR para unirse a ese ligando a una temperatura particular puede usarse para determinar la termoestabilidad del mutante. Puede ser conveniente determinar una "cuasi T_m ", es decir, la temperatura a la que se inactiva el 50 % del receptor en las condiciones establecidas después de la incubación durante un período de tiempo determinado (por ejemplo, 30 minutos). Los GPCR mutantes de mayor termoestabilidad tienen una cuasi T_m aumentada en comparación con sus parentales.

20 En relación con una mayor estabilidad frente a un detergente o a un caótropo, típicamente el GPCR se incuba durante un tiempo definido en presencia de un detergente de ensayo o un agente caotrópico de ensayo y la estabilidad se determina usando, por ejemplo, la unión de ligandos o un método espectroscópico como se ha discutido anteriormente.

En relación con un pH extremo, se elegiría un pH de ensayo típico (por ejemplo, en el rango de 4,5 a 5,5 (pH bajo) o en el rango de 8,5 a 9,5 (pH alto).

25 Debido a que se usan detergentes relativamente agresivos durante los procedimientos de cristalización, se prefiere que el GPCR mutante sea estable en presencia de dichos detergentes. El orden de "dureza" de ciertos detergentes es DDM, $C_{11} \rightarrow C_{10} \rightarrow C_9 \rightarrow C_8$ maltósido o glucósido, óxido de laurildimetilamina (LDAO) y SDS. Se prefiere particularmente que el GPCR mutante sea más estable frente a cualquiera de maltósido o glucósido C_9 , maltósido o glucósido C_8 , LDAO y SDS, por lo que se prefiere que estos detergentes se usen para los ensayos de estabilidad.

30 Debido a su facilidad de determinación, se prefiere determinar la termoestabilidad, y se eligen aquellos mutantes que tienen una termoestabilidad aumentada en comparación con la proteína parental con respecto a la condición seleccionada. Se apreciará que el calor actúa como desnaturalizante, y este puede eliminarse fácilmente enfriando la muestra, por ejemplo, colocándola sobre hielo. Se cree que la termoestabilidad también puede ser una guía para la estabilidad frente a otros desnaturalizantes o condiciones desnaturalizantes. Por lo tanto, es probable que el aumento de la termoestabilidad se traduzca en estabilidad en los detergentes desnaturalizantes, especialmente aquellos que son más desnaturalizantes que el DDM, por ejemplo, aquellos detergentes con un grupo de cabeza más pequeño y una cadena de alquilo más corta y/o con un grupo de cabeza cargado. Hemos descubierto que un GPCR termoestable también es más estable frente a los detergentes agresivos.

35 Cuando se usa un pH extremo como condición desnaturalizante, se apreciará que este se puede eliminar rápidamente añadiendo un agente neutralizante. De manera similar, cuando se usa un caótropo como desnaturalizante, el efecto desnaturalizante se puede eliminar diluyendo la muestra por debajo de la concentración en la que el caótropo ejerce su efecto caotrópico.

40 En el método de selección, el GPCR puede ser un receptor β -adrenérgico (por ejemplo, de pavo) y el ligando es el dihidroalprenolol (DHA), un antagonista.

45 En un caso adicional, el GPCR puede ser el receptor de adenosina A_{2a} (A_{2a}R) (por ejemplo, de hombre) y el ligando es ZM 241385 (4-[2-[[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]-triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-il]amino]etil]fenol), un antagonista o NECA (5'-N-etilcarboxamido adenosina), un agonista.

En otro caso adicional, el GPCR es el receptor de neurotensina (NTR) (por ejemplo, de rata) y el ligando es la neurotensina, un agonista.

Método 2

50 Un método para preparar un GPCR mutante seleccionado como se ha indicado anteriormente comprende:

- (a) llevar a cabo un método para seleccionar un GPCR mutante tal como se describió anteriormente,
- (b) identificar la posición o las posiciones del residuo o residuos de aminoácidos mutados en el GPCR o los GPCR mutantes que se han seleccionado para aumentar la estabilidad, y

- (c) sintetizar un GPCR mutante que contiene una mutación en una o más de las posiciones identificadas.

Como puede verse en los Ejemplos, sorprendentemente, los cambios en un solo aminoácido dentro del GPCR pueden aumentar la estabilidad de la proteína en comparación con la proteína parental con respecto a una condición particular en la que la proteína reside en una conformación particular. Por lo tanto, en una realización, un único residuo de aminoácido de la proteína parental se cambia en la proteína mutante.

También como se puede observar en los Ejemplos, se puede obtener un aumento adicional de la estabilidad reemplazando más de uno de los aminoácidos de la proteína parental. Típicamente, cada uno de los aminoácidos reemplazados es uno que se ha identificado usando el método de selección descrito anteriormente. Típicamente, cada aminoácido identificado se reemplaza por el aminoácido presente en la proteína mutante, aunque, como se indicó anteriormente, puede reemplazarse con cualquier otro aminoácido.

Típicamente, el GPCR mutante contiene, en comparación con la proteína parental, de 1 a 10 aminoácidos reemplazados, preferentemente de 1 a 8, típicamente de 2 a 6, tal como 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos reemplazados.

Se apreciará que los mutantes múltiples pueden someterse al método de selección. En otras palabras, se pueden proporcionar múltiples mutantes en la etapa (a) de la selección. Se apreciará que se pueden preparar GPCR mutagenizados de forma múltiple, cuya conformación se ha seleccionado para crear una proteína mutante de puntos múltiples muy estable.

Los GPCR mutantes se pueden preparar mediante cualquier método adecuado. Convenientemente, la proteína mutante está codificada por una molécula de ácido nucleico adecuada y se expresa en una célula huésped adecuada. Las moléculas de ácido nucleico adecuadas que codifican el GPCR mutante pueden prepararse usando técnicas de clonación estándar, mutagénesis dirigida al sitio y PCR, como es bien conocido en la técnica. Los sistemas de expresión adecuados incluyen sistemas de expresión constitutivos o inducibles en bacterias o levaduras, sistemas de expresión de virus tales como baculovirus, virus del bosque semliki y lentivirus, o transfección transitoria en células de insectos o mamíferos. Las células huésped adecuadas incluyen células de *E. coli*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusiani*. Las células huésped animales adecuadas incluyen HEK 293, COS, S2, CHO, NSO, DT40, etc. Se sabe que algunos GPCR requieren lípidos específicos (por ejemplo, colesterol) para funcionar. En ese caso, es deseable seleccionar una célula huésped que contenga el lípido. Adicional o alternativamente, el lípido puede añadirse durante el aislamiento y la purificación de la proteína mutante. Se apreciará que estos sistemas de expresión y células huésped también pueden usarse para proporcionar el GPCR mutante en la parte (a) del método de selección.

Los métodos de biología molecular para clonar y modificar por ingeniería genes y ADNc, para mutar el ADN y para expresar polipéptidos de polinucleótidos en células huésped son bien conocidos en la técnica, como se ejemplifica en "Molecular cloning, a laboratory manual", tercera edición, Sambrook, J. y Russell, D.W. (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Se aprecia que se puede determinar si el GPCR mutante seleccionado o preparado es capaz de acoplarse a una proteína G. También se prefiere determinar si el GPCR mutante seleccionado o preparado es capaz de unirse a una pluralidad de ligandos de la misma clase que el ligando de selección con un orden de afinidad de dispersión y/o rango comparable al del GPCR parental.

Método 3

Como se muestra en los Ejemplos 1-3 y se describe anteriormente, las mutaciones termoestabilizadoras están ampliamente dispersas por las secuencias del receptor beta adrenérgico 1 de pavo, el receptor de adenosina humano, el receptor de neurotensina de rata y el receptor muscarínico humano. La Figura 17 proporciona una alineación de estas secuencias con la secuencia del beta-2AR humano. de manera que cuando las mutaciones termoestabilizadoras se posicionan en las secuencias, entonces, en 11 casos de un total de 70, dos secuencias contienen mutaciones en la misma posición (indicadas en la Figura 17 con una estrella). Por lo tanto, se apreciará que, una vez que se han identificado una o más mutaciones estabilizadoras en un GPCR, se puede generar otro GPCR con mayor estabilidad alineando las secuencias de aminoácidos de los GPCR y realizando la misma una o más mutaciones en la posición o posiciones correspondientes. Este concepto se ejemplifica claramente en la Figura 26. en donde las seis mutaciones termoestabilizadoras en el β1-m23 de pavo se transfirieron directamente al receptor β2 humano. El mutante resultante, β2-m23, tenía una Tm 12 °C más alta que la del receptor β2 humano.

Por consiguiente, un método adicional para producir un GPCR mutante con mayor estabilidad en relación con su GPCR parental comprende

- (i) identificar en la secuencia de aminoácidos de uno o más mutantes de un primer GPCR parental con mayor estabilidad con respecto al primer GPCR parental, la posición o posiciones en las que uno o más mutantes tienen al menos un residuo de aminoácido diferente en comparación con el primer GPCR parental, y
- (ii) realizar una o más mutaciones en la secuencia de aminoácidos que define un segundo GPCR en la posición o posiciones correspondientes, para proporcionar uno o más mutantes de un segundo GPCR parental con

mayor estabilidad en relación con el segundo GPCR parental.

- El uno o más mutantes de un primer GPCR parental pueden seleccionarse o prepararse según los métodos de selección o preparación descritos anteriormente. Por tanto, este método puede usarse para crear GPCR estables y bloqueados conformacionalmente mediante mutagénesis. Por ejemplo, tras la selección de los GPCR mutantes que tienen mayor estabilidad en una conformación particular, se puede identificar la mutación estabilizadora y reemplazar el aminoácido en una posición correspondiente en un segundo GPCR para producir un GPCR mutante con mayor estabilidad en una conformación particular en relación con un segundo GPCR parental.

Para evitar dudas, el primer GPCR parental puede ser un GPCR que tiene una secuencia de origen natural, o puede ser una forma truncada o puede ser una fusión, ya sea con la proteína de origen natural o con un fragmento de la misma, o puede contener mutaciones en comparación con la secuencia de origen natural, siempre que retenga la capacidad de unión al ligando.

Típicamente, la identificación de la posición o las posiciones en las que uno o más mutantes tienen al menos un residuo de aminoácido diferente en comparación con el primer GPCR parental implica alinear sus secuencias de aminoácidos con las del GPCR parental, por ejemplo, utilizando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994).

Por "posición o posiciones correspondientes", incluimos el significado de la posición en la secuencia de aminoácidos de un segundo GPCR que se alinea con la posición en la secuencia de aminoácidos del primer GPCR, cuando el primer y el segundo GPCR se comparan mediante alineación, por ejemplo, utilizando MacVector y Clustal W. Por ejemplo, como se muestra en la alineación de la Figura 17, las seis mutaciones estabilizadoras en $\beta 1\text{-m23}$ de pavo, R68S, M90V, Y227A, A282L, F327A y F338M están en posiciones que corresponden a los residuos K60, M82, Y219, C265, L310 y F321, respectivamente, en el receptor $\beta 2$ humano.

Habiendo identificado la posición o posiciones correspondientes en la secuencia de aminoácidos de un segundo GPCR, los aminoácidos en esas posiciones se reemplazan por otro aminoácido. Típicamente, los aminoácidos se reemplazan con los mismos aminoácidos que reemplazaron a los aminoácidos en las posiciones correspondientes en el mutante del primer GPCR parental (a menos que ya sean ese residuo). Por ejemplo, en la posición 68 en $\beta 1\text{-m23}$ de pavo (R68S), se reemplazó un residuo de arginina por un residuo de serina. Por lo tanto, en la posición correspondiente en el receptor $\beta 2$ humano, posición 60 (K60), el residuo de lisina se reemplaza preferiblemente por un residuo de serina.

Las mutaciones se pueden realizar en una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, como se describió anteriormente y usando técnicas bien establecidas en la técnica.

Se apreciará que el segundo GPCR puede ser cualquier otro GPCR. Por ejemplo, las mutaciones estabilizadoras en un GPCR de una especie pueden transferirse a un segundo GPCR de otra especie. De manera similar, las mutaciones estabilizadoras en una isoforma de GPCR particular pueden transferirse a un segundo GPCR que es una isoforma diferente. Preferiblemente, el segundo GPCR parental es de la misma clase o familia de GPCR que el primer GPCR parental. Los análisis filogenéticos han dividido los GPCR en tres clases principales sobre la base de la similitud de la secuencia de proteínas, es decir, las clases 1, 2 y 3 cuyos prototipos son la rodopsina, el receptor de secretina y los receptores metabotrópicos del glutamato, respectivamente (Foord *et al.* (2005) *Pharmacol. Rev.* **57**, 279-288). Por lo tanto, el segundo GPCR puede ser un GPCR que sea de la misma clase de GPCR que el primer GPCR parental. De la misma manera, los GPCR se han dividido en familias por referencia a ligandos naturales como el glutamato y el GABA. Por lo tanto, el segundo GPCR puede ser de la misma familia de GPCR que el primer GPCR parental. La Unión Internacional de Farmacología ha elaborado una lista de clases y familias de GPCR (Foord *et al.* (2005) *Pharmacol. Rev.* **57**, 279-288) y esta lista se actualiza periódicamente en <http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorFamiliesForward>.

Se apreciará que el segundo GPCR parental debe poder alinearse con el primer GPCR parental. de manera que las posiciones correspondientes de las mutaciones en el primer GPCR se pueden determinar en el segundo GPCR. Por lo tanto, típicamente, el segundo GPCR parental tiene al menos un 20 % de identidad de secuencia con el primer GPCR parental y, más preferentemente, al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia con el primer GPCR parental. Sin embargo, algunos GPCR tienen una identidad de secuencia baja (por ejemplo, los GPCR de las familias B y C) y, al mismo tiempo, tienen una estructura muy similar. Por lo tanto, el umbral de identidad de secuencia del 20 % no es absoluto.

50 Método 4

Los inventores han razonado que la identificación de restos estructurales en los que residen la una o más mutaciones en un GPCR mutante con mayor estabilidad será útil para producir otros GPCR mutantes con mayor estabilidad.

Por consiguiente, un método adicional para producir un receptor acoplado a proteína G (GPCR) mutante con mayor estabilidad en relación con su GPCR parental comprende:

- 55 a. proporcionar uno o más mutantes de un primer GPCR parental con una mayor estabilidad en relación con el primer GPCR parental

- b. identificar en un modelo de proteína de membrana estructural el resto o restos estructurales en los que uno o más mutantes tienen al menos un residuo de aminoácido diferente en comparación con el primer GPCR parental, y
- c. realizar una o más mutaciones en la secuencia de aminoácidos que define un resto o restos estructurales correspondientes en un segundo GPCR parental, para proporcionar uno o más mutantes de un segundo GPCR parental con mayor estabilidad en relación con el segundo GPCR parental.

El mapeo de mutaciones estabilizadoras en uno o más modelos estructurales conocidos puede usarse para identificar restos estructurales particulares en los que residen dichas mutaciones estabilizadoras. Hemos mapeado las mutaciones estabilizadoras del receptor β_1 adrenérgico en modelos estructurales del receptor β_2 adrenérgico (Rasmussen *et al* (2007) *Nature* 450, 383-387; Cherezov *et al* (2007) *Science* 318:1258-65; Rosenbaum *et al* (2007) *Science* 318:1266-1273) con el fin de identificar dichos restos. Por ejemplo, la Tabla (vi) enumera las mutaciones del receptor β_1 adrenérgico de pavo que hemos mapeado en el receptor β_2 adrenérgico humano y describe los restos estructurales correspondientes en los que residen. Como se discute en el Ejemplo 4, el mapeo de la mutación Y227A (equivalente a Y219 en el receptor β_2 humano) en el receptor β_2 adrenérgico humano revela su posición en la interfaz entre las hélices de modo que la mutación puede mejorar el empaquetamiento en la interfaz helicoidal (véanse las Figuras 15, 16 y 23). De manera similar, el mapeo de la mutación M90V (equivalente a M82 en el receptor β_2 humano) en el receptor β_2 adrenérgico humano revela que está en la hélice 2 en un punto en el que la hélice está doblada (véanse las Figuras 15, 16 y 20). Se descubrió que otras mutaciones residían en otros restos estructurales incluidas las superficies de la hélice transmembrana que apuntan hacia la bicapa lipídica, las regiones límite hidrófobas-hidrófilas, los bolsillos de unión a proteínas y las regiones en bucle (véase la Tabla) (vi) y las Figuras 18-19, 21-22 y 24-25).

Dichos restos estructurales, en virtud de que contienen mutaciones estabilizadoras, son importantes para determinar la estabilidad de las proteínas. Por lo tanto, el direccionamiento de las mutaciones a estos restos facilitará la generación de GPCR mutantes estabilizados. De hecho, hubo varios casos en los que más de una mutación se mapeó en el mismo resto estructural. Por ejemplo, las mutaciones Y227A, V230A y A234L en el receptor β_1 adrenérgico de pavo se mapearon en la misma interfaz helicoidal, las mutaciones V89L y M90V se mapearon en la misma torsión helicoidal y las mutaciones F327A y A334L se mapearon en la misma superficie helicoidal que apunta hacia la bicapa lipídica (Tabla (vi)). Por lo tanto, cuando se ha identificado una mutación estabilizadora, la determinación del resto estructural en el que se encuentra esa mutación permitirá la identificación de mutaciones estabilizadoras adicionales.

El uno o más mutantes de un primer GPCR parental pueden seleccionarse o prepararse según cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Por tanto, este método puede usarse para crear GPCR estables y bloqueados conformacionalmente mediante mutagénesis. Por ejemplo, tras la selección de los GPCR mutantes que tienen una mayor estabilidad en una conformación particular, se pueden identificar los restos estructurales en los que residen dichas mutaciones estabilizadoras. La realización de una o más mutaciones en la secuencia de aminoácidos que define el resto estructural correspondiente en otro GPCR puede usarse entonces para producir un GPCR mutante con mayor estabilidad en una conformación particular en relación con su GPCR parental.

Hemos realizado un alineamiento de múltiples secuencias de las secuencias de aminoácidos de beta-2AR humano, NTR1 de rata, beta-1 AR de pavo, adenosina A_{2a}R humana y receptor M1 muscarínico humano (Figura 17), que muestra que, cuando las mutaciones termoestabilizadoras identificadas (véanse los Ejemplos 1-3) se colocan en las secuencias, en 11 casos de un total de 70, dos secuencias contienen mutaciones en la misma posición (indicadas en la Figura 17 con una estrella). Sin pretender limitarse a ninguna teoría, los inventores creen que las mutaciones termoestabilizadoras en estas posiciones deberían ser de mayor transferibilidad para mapearlas en un modelo de proteína de membrana estructural.

Con el fin de identificar el resto o restos estructurales, las mutaciones estabilizadoras se mapean en una estructura conocida de una proteína de membrana.

Por "proteína de membrana" nos referimos a una proteína que está unida o asociada a una membrana de una célula u orgánulo. Preferiblemente, la proteína de membrana es una proteína de membrana integral que se integra permanentemente en la membrana y solo se puede retirar usando detergentes, disolventes no polares o agentes desnaturalizantes que alteran físicamente la bicapa lipídica.

El modelo estructural de una proteína de membrana puede ser cualquier modelo estructural adecuado. Por ejemplo, el modelo puede ser una estructura cristalina conocida. Los ejemplos de estructuras cristalinas de GPCR incluyen la rodopsina bovina (Palczewski, K. *et al.*, *Science* 289, 739-745. (2000)) y el receptor β_2 adrenérgico humano (Rasmussen *et al*, *Nature* 450, 383-7 (2007); Cherezov *et al* (2007) *Science* 318:1258-65; Rosenbaum *et al* (2007) *Science* 318:1266-1273). Las coordenadas de la estructura del receptor β_2 adrenérgico humano se pueden encontrar en el banco de datos de proteínas del RCSB con los códigos de acceso: 2rh1, 2r4r y 2r4s. Alternativamente, el modelo estructural puede ser un modelo generado por ordenador basado en la homología o utilizando métodos de predicción de estructura *de novo* (Qian *et al.*, *Nature* (2007) 450: 259-64).

Se apreciará que las mutaciones estabilizadoras de un GPCR mutante dado pueden mapearse en un modelo estructural de cualquier proteína de membrana que tenga suficiente similitud estructural con el GPCR. En particular,

el dominio de la proteína de membrana debe tener una similitud estructural suficiente con el dominio del GPCR en el que reside la mutación estabilizadora, para que una mutación dada sea transferible.

5 Un dominio de proteína se define típicamente como un ensamblaje plegado discretamente de elementos de estructura secundaria que pueden ser independientes como una sola proteína o ser parte de una proteína más grande en combinación con otros dominios. Por lo general, es una unidad evolutiva funcional.

Los GPCR son esencialmente proteínas de dominio único, excluyendo aquellas con dominios N-terminales grandes. Por lo tanto, típicamente, el modelo estructural es de una proteína de membrana que comprende al menos un dominio que tiene suficiente similitud estructural con el GPCR.

10 La similitud estructural se puede determinar indirectamente mediante el análisis de la identidad de secuencia, o directamente mediante la comparación de estructuras.

15 Con respecto a la identidad de secuencia, la secuencia de aminoácidos que codifica el dominio de GPCR en la que el mutante tiene al menos un residuo de aminoácido diferente en comparación con el primer GPCR parental, se alinea con una secuencia de aminoácidos que codifica un dominio de una proteína de membrana para la que está disponible un modelo estructural. Se apreciará que una o más de estas secuencias pueden contener una secuencia insertada o extensiónes N-terminales o C-terminales que son adicionales al dominio central conservado. Para una alineación óptima, dichas secuencias se eliminan para no sesgar el análisis. Las proteínas de membrana con suficiente identidad de secuencia en el dominio en cuestión pueden usarse entonces como modelo estructural para mapear mutaciones. Se ha mostrado para los dominios de proteínas solubles que su estructura 3D se conserva ampliamente por encima del 20 % de identidad de secuencia y se conserva bien por encima del 30 % de identidad, y el nivel de conservación estructural aumenta a medida que la identidad de secuencia aumenta hasta el 100 % (Ginalski, K. *Curr Op Struc Biol* (2006) 16, 172-177).

20 La identidad de secuencia puede medirse mediante el uso de algoritmos tales como BLAST o PSI-BLAST (Altschul et al, *NAR* (1997), 25, 3389-3402) o métodos basados en modelos ocultos de Markov (Eddy S et al, *J Comput Biol* (1995) Spring 2 (1) 9-23). Típicamente, el porcentaje de identidad de secuencia entre dos polipéptidos puede determinarse usando cualquier programa informático adecuado, por ejemplo, el programa GAP del Grupo de Computación Genética de la Universidad de Wisconsin, y se apreciará que el porcentaje de identidad se calcula en relación con los polipéptidos cuya secuencia se ha alineado de manera óptima. La alineación puede llevarse a cabo alternativamente usando el programa Clustal W (Thompson et al., 1994). Los parámetros utilizados pueden ser los siguientes: Parámetros de alineación rápida por pares: Tamaño de tupla K (palabra); 1, tamaño de ventana; 5, penalización por hueco; 3, número de diagonales superiores; 5. Método de puntuación: x por ciento. Parámetros de alineación múltiples: penalización por hueco abierto; 10, penalización por extensión de hueco; 0,05. Matriz de puntuación: BLOSUM.

25 Además de la identidad de secuencia, la similitud estructural se puede determinar directamente mediante la comparación de modelos estructurales. Los modelos estructurales pueden usarse para detectar regiones de similitud estructural que no son evidentes solo a partir del análisis de secuencia, y que pueden o no ser contiguas en la secuencia. Por ejemplo, se cree que los GPCR de las familias B y C comparten estructuras similares; sin embargo, su identidad de secuencia es muy baja. De la misma manera, las acuaporinas que transportan agua de espinaca SoPIP2, AqpZ de *E. coli*, AqpM de *Methanococcus*, Aqp4 de rata, Aqp1 humana y Aqp0 de oveja comparten una identidad de secuencia baja, pero todas tienen estructuras similares.

30 35 40 45 50 55 60 Se pueden construir modelos estructurales de alta fidelidad para proteínas de estructura desconocida utilizando paquetes de software estándar tales como MODELLER (Sali A y Blundell T, *J Mol Biol* (1993) 234(3) 779-815), en donde la estructura se modela sobre una estructura conocida de una proteína homóloga. Tal modelado mejora con el aumento de la identidad de secuencia. Típicamente, la identidad de secuencia entre la secuencia de estructura desconocida y una secuencia de estructura 3D conocida es de más del 30 % (Ginalski, K. *Curr Op Struc Biol* (2006) 16, 172-177). Además, los métodos de predicción de la estructura *de novo* basados solo en la secuencia pueden usarse para modelar proteínas de estructura desconocida (Qian et al, (2007) *Nature* 450:259-64). Una vez que las estructuras se han determinado experimentalmente o se han obtenido mediante modelado, las regiones de similitud estructural pueden detectarse mediante la comparación directa de dos o más estructuras 3D. Pueden comprender, por ejemplo, elementos de estructura secundaria de una arquitectura y topología particulares que pueden detectarse mediante el uso de software como DALI (Holm, L y Sander, C (1996) *Science* 273, 595-603). Pueden comprender disposiciones locales de las cadenas laterales de aminoácidos y la cadena principal del polipéptido, o conjuntos específicos de átomos o grupos de átomos en una disposición espacial particular, que también pueden detectarse, por ejemplo, mediante el uso de representaciones teóricas gráficas (Artymiuk, P et al, (2005) *J Amer Soc Info Sci Tech* 56 (5) 518-528). En este enfoque, los átomos o grupos de átomos dentro de las proteínas o regiones de las proteínas que se van a comparar se representan típicamente como los nodos de un grafo, y los bordes del gráfico describen los ángulos y las distancias entre los nodos. Los patrones comunes en estos gráficos indican restos estructurales comunes. Este enfoque puede ampliarse para incluir cualquier descriptor de átomos o grupos de átomos, como el donador o acceptor de enlaces de hidrógeno, la hidrofobicidad, la forma, la carga o la aromaticidad; por ejemplo, las proteínas pueden mapearse espacialmente de acuerdo con dichos descriptores utilizando GRID y esta representación usarse como base para la búsqueda de similitudes (Baroni et al (2007) *J Chem Inf Mod* 47, 279-294). Las descripciones de los métodos, la disponibilidad del software y las directrices para la selección definida por el usuario de parámetros,

umbrales y tolerancias se describen en las referencias proporcionadas anteriormente.

La Unión Internacional de Farmacología ha elaborado una lista de clases y familias de GPCR (Foord *et al* (2005) *Pharmacol. Rev.* **57**, 279-288 y esta lista se actualiza periódicamente en <http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorFamiliesForward>.

- 5 El mapeo de las mutaciones estabilizadoras en el modelo estructural se puede realizar usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, típicamente, la secuencia de aminoácidos del GPCR para la que está disponible el modelo estructural se alinea con la secuencia de aminoácidos del mutante del primer GPCR parental. La posición o las posiciones del al menos un residuo de aminoácido diferente en el GPCR mutante con respecto al primer GPCR parental pueden localizarse entonces en la secuencia de aminoácidos del GPCR para la que está disponible un modelo estructural.

10 Por "resto estructural" incluimos el significado de una descripción tridimensional de la ubicación en un modelo estructural de GPCR de una mutación termoestabilizadora. Por ejemplo, el resto estructural puede ser cualquier resto de estructura secundaria o terciaria dentro del GPCR. Por "resto de estructura terciaria" incluimos cualquier descriptor de átomos o grupos de átomos, como el donador o acceptor de enlaces de hidrógeno, la hidrofobicidad, la forma, la carga o la aromaticidad. Por ejemplo, las proteínas pueden mapearse espacialmente de acuerdo con dichos descriptores usando GRID y esta representación usarse como base para definir un resto estructural (Baroni *et al* (2007) *J Chem Inf Mod* **47**, 279-294).

20 La Tabla (vi) enumera los restos estructurales en los que se descubrió que residían las mutaciones estabilizadoras del receptor $\beta 1$ adrenérgico de pavo. Como se ve en la tabla, las mutaciones se encuentran en varias localizaciones distintas. Hay tres mutaciones en regiones de bucle que se prevé que sean accesibles al disolvente acuoso. Ocho mutaciones se encuentran en las hélices α transmembrana y apuntan a la bicapa lipídica; tres de estas mutaciones se encuentran cerca del final de las hélices y se puede considerar que se encuentran en la capa límite hidrófoba-hidrófila. Se encuentran ocho mutaciones en las interfaces entre las hélices α transmembrana, tres de las cuales se encuentran dentro de una región retorcida o distorsionada de la hélice y otras dos mutaciones ocurren en una hélice, pero están adyacentes a una o más hélices que contienen una torsión adyacente en el espacio al residuo mutado. Estas últimas mutaciones podrían afectar al empaquetamiento de los aminoácidos dentro de la región retorcida, lo que podría resultar en una termoestabilización. Otra mutación se encuentra en un bolsillo de unión al sustrato.

25 Por consiguiente, en una realización, el resto estructural es cualquiera de una interfaz helicoidal, una torsión helicoidal, una hélice opuesta a una torsión helicoidal, una superficie helicoidal que apunta a la bicapa lipídica, una superficie helicoidal que apunta a la bicapa lipídica en la capa límite hidrófoba-hidrófila, una región de bucle o un bolsillo de unión a proteínas.

30 La identificación de un resto estructural en el que reside una mutación estabilizadora sugiere la importancia de ese resto en la estabilidad de las proteínas. Por lo tanto, la realización de una o más mutaciones en la secuencia de aminoácidos que define un resto o restos estructurales correspondientes en un segundo GPCR parental, debería proporcionar uno o más mutantes de un segundo GPCR parental con mayor estabilidad en relación con el segundo GPCR parental.

35 La secuencia de aminoácidos que define un resto estructural es la secuencia de aminoácidos primaria de los residuos de aminoácidos que se combinan en la estructura secundaria o terciaria de la proteína para formar el resto estructural. Se apreciará que dicha secuencia de aminoácidos primaria puede comprender residuos de aminoácidos contiguos o no contiguos. Por lo tanto, la identificación de la secuencia de aminoácidos que define el resto estructural implicará determinar los residuos implicados y, posteriormente, definir la secuencia. Las mutaciones se pueden realizar en una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, como se describió anteriormente y usando técnicas bien establecidas en la técnica.

40 Por "resto o restos estructurales correspondientes", nos referimos al resto o restos estructurales análogos identificados en el modelo estructural que están presentes en el segundo GPCR parental. Por ejemplo, si se identificó una interfaz helicoidal, la interfaz helicoidal correspondiente en el segundo GPCR parental sería la interfaz entre las hélices que son análogas a las hélices presentes en el modelo estructural. Si se identificara una torsión helicoidal, la torsión helicoidal correspondiente sería la torsión en la hélice que es análoga a la hélice retorcida presente en el modelo estructural. Un resto o restos estructurales análogos en el segundo GPCR parental pueden identificarse buscando secuencias de aminoácidos similares en la secuencia del segundo GPCR parental que definen el resto o restos en el modelo estructural, por ejemplo, mediante alineación de secuencias. Además, los algoritmos informáticos están ampliamente disponibles en la técnica y pueden usarse para predecir la presencia de restos proteicos basándose en una secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, basándose en la posición relativa de un resto particular dentro de la secuencia de aminoácidos y su posición en relación con otros restos, se puede identificar fácilmente un resto estructural análogo. Se apreciará que, si está disponible un modelo estructural del segundo GPCR parental, el resto o restos estructurales análogos pueden mapearse directamente en la estructura de la proteína. Típicamente, la secuencia de aminoácidos que define el resto estructural análogo tiene al menos un 20 % de identidad de secuencia con la secuencia que define el resto en el modelo estructural, más preferentemente al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % y 90 % de identidad de secuencia y aún más preferentemente un 95 % y 99 % de identidad de secuencia.

Se pueden usar GPCR mutantes con mayor estabilidad en comparación con sus GPCR parentales, particularmente aquellos con mayor termoestabilidad. A continuación, se proporcionan ejemplos particulares de GPCR mutantes adecuados para su uso en la presente invención.

5 La alineación de las secuencias de aminoácidos del receptor $\beta 1$ AR de pavo, el receptor de adenosina humano, el receptor de neurotensina de rata y el receptor muscarínico humano en la Figura 17 muestra que en 11 de los 70 casos, dos secuencias contienen mutaciones en la misma posición, es decir, en las siguientes posiciones según la numeración del AR beta2 humano tal como se establece en la Figura 17: Ala 59, Val 81, Ser 143, Lys 147, Val 152, Glu 180, Val 222, Ala 226, Ala 271, Leu 275 y Val 317. Por lo tanto, en una realización adicional, el GPCR mutante es uno que tiene, en comparación con su receptor parental, un aminoácido diferente en una cualquiera de estas posiciones.

10 Receptor β -adrenérgico mutante

Los receptores β -adrenérgicos son bien conocidos en la técnica. Comparten homología de secuencia entre sí y se unen a la adrenalina.

15 En una realización, el GPCR mutante es un receptor β -adrenérgico mutante que, cuando se compara con el correspondiente receptor β -adrenérgico de tipo salvaje, tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a una cualquiera o más de las siguientes posiciones según la numeración del receptor β -adrenérgico de pavo tal como se establece en la Figura 9: Ile 55, Gly 67, Arg 68, Val 89, Met 90, Gly 98, Ile 129, Ser 151, Val 160, Gln 194, Leu 221, Tyr 227, Arg 229, Val 230, Ala 234, Ala 282, Asp 322, Phe 327, Ala 334, Phe 338.

20 El receptor β -adrenérgico mutante puede ser un mutante de cualquier receptor β -adrenérgico humano, siempre que esté mutado en una o más de las posiciones de los aminoácidos, tal como se indica haciendo referencia a la secuencia de aminoácidos del receptor β -adrenérgico de pavo dada.

25 Se prefiere particularmente que el GPCR mutante sea uno que tenga al menos un 20 % de identidad de secuencia de aminoácidos cuando se compara con la secuencia del receptor β -adrenérgico de pavo dada, tal como se determina usando MacVector y CLUSTALW (Thompson *et al* (1994) *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673-4680). Más preferentemente, el receptor mutante tiene al menos un 30 % o al menos un 40 % o al menos un 50 % de identidad de secuencia de aminoácidos. En general, existe un mayor grado de identidad de secuencia de aminoácidos que se conserva alrededor del sitio ortostórico ("activo") al que se une el ligando natural.

30 Como se describe en el Ejemplo 1 y en la Figura 1 a continuación, el reemplazo individual de los siguientes residuos de aminoácidos en la secuencia β -adrenérgica de pavo parental (como se muestra en la Figura 9) conduce a un aumento de la termoestabilidad: Ile 55, Gly 67, Arg 68, Val 89, Met 90, Gly 98, Ile 129, Ser 151, Val 160, Gln 194, Leu 221, Tyr 227, Arg 229, Val 230, Ala 234, Ala 282, Asp 322, Phe 327, Ala 334, Phe 338.

35 Se pueden usar receptores β -adrenérgicos humanos mutantes en los que uno o más aminoácidos correspondientes en el receptor parental se reemplazan por otro residuo de aminoácido.

40 En una realización, el GPCR mutante es un receptor β -adrenérgico mutante que tiene al menos un residuo de aminoácido diferente en un resto estructural en el que el receptor mutante, en comparación con su receptor parental, tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a cualquiera de las siguientes posiciones según la numeración del receptor β -adrenérgico de pavo, tal como se establece en la Figura 9: Ile 55, Gly 67, Arg 68, Val 89, Met 90, Gly 98, Ile 129, Ser 151, Val 160, Gln 194, Leu 221, Tyr 227, Arg 229, Val 230, Ala 234, Ala 282, Asp 322, Phe 327, Ala 334, Phe 338.

45 Para evitar dudas, el parental puede ser un receptor β -adrenérgico humano que tiene una secuencia de origen natural.

50 Por "residuo de aminoácido correspondiente" incluimos el significado del residuo de aminoácido en otro receptor β -adrenérgico que se alinea con el residuo de aminoácido dado en el receptor β -adrenérgico de pavo cuando se comparan el receptor β -adrenérgico de pavo y el otro receptor β -adrenérgico utilizando MacVector y CLUSTALW.

La Figura 9 muestra una alineación entre el receptor β -adrenérgico de pavo y los receptores β -adrenérgicos $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ humanos.

55 Se puede observar que la Ile 72 del $\beta 1$ humano corresponde a la Ile 55 del receptor β -adrenérgico de pavo; la Ile 47 del $\beta 2$ humano corresponde a la Ile 55 del receptor β -adrenérgico de pavo; y la Thr 51 del $\beta 3$ humano corresponde a la Ile 55 del receptor β -adrenérgico de pavo. Otros residuos de aminoácidos correspondientes en $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ humanos pueden identificarse fácilmente haciendo referencia a la Figura 9.

60 Se prefiere que el aminoácido particular se reemplace por una Ala. Sin embargo, cuando el residuo de aminoácido particular es una Ala, se prefiere que se reemplace por una Leu (por ejemplo, véanse Ala 234, Ala 282 y Ala 334 en β -adrenérgico de pavo en la Figura 1).

65 Se prefiere que el receptor β -adrenérgico mutante tenga un aminoácido diferente en comparación con su parental en más de una posición de aminoácido, ya que es probable que esto proporcione una mayor estabilidad. Los mutantes del receptor $\beta 1$ humano particularmente preferidos son aquellos en los que uno o más de los siguientes residuos de

aminoácidos se reemplazan por otro residuo de aminoácido: K85, M107, Y244, A316, F361 y F372. Típicamente, el residuo de aminoácido dado se reemplaza con Ala o Val o Met o Leu o Ile (a menos que ya sean ese residuo).

Se prefieren los receptores $\beta 1$ humanos mutantes que tienen combinaciones de 3 o 4 o 5 o 6 mutaciones como se ha descrito anteriormente.

5 Los mutantes del receptor $\beta 2$ humano particularmente preferidos son aquellos en los que uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos se reemplazan por otro residuo de aminoácido: K60, M82, Y219, C265, L310 y F321. Típicamente, el residuo de aminoácido dado se reemplaza con Ala o Val o Met o Leu o Ile (a menos que ya sean ese residuo).

10 Se prefieren los receptores $\beta 2$ humanos mutantes que tienen combinaciones de 3 o 4 o 5 o 6 mutaciones como se ha descrito anteriormente.

La Figura 26 muestra el efecto sobre la termoestabilidad cuando seis mutaciones termoestabilizadoras en el $\beta 1$ -m23 (R68S, M90V, Y227A, A282L, F327A, F338M) se transfirieron directamente al receptor $\beta 2$ humano (mutaciones equivalentes K60S, M82V, Y219A, C265L, L310A, F321M), lo que produce el $\beta 2$ -m23 humano. Las Tm de $\beta 2$ y $\beta 2$ -m23 humanos fueron de 29 °C y 41 °C respectivamente, lo que ejemplifica la transferibilidad de las mutaciones termoestabilizadoras de un receptor a otro receptor. Por consiguiente, un mutante del receptor $\beta 2$ humano particularmente preferido es uno que comprende las mutaciones K60S, M82V, Y219A, C265L, L310A, F321M.

15 Los mutantes del receptor $\beta 3$ humano particularmente preferidos son aquellos en los que uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos se reemplazan por otro residuo de aminoácido: W64, M86, Y224, P284, A330 y F341. Típicamente, el residuo de aminoácido dado se reemplaza con Ala o Val o Met o Leu o Ile (a menos que ya sean ese residuo).

20 Se prefieren los receptores $\beta 3$ humanos mutantes que tienen combinaciones de 3 o 4 o 5 o 6 mutaciones como se ha descrito anteriormente.

25 Las combinaciones particularmente preferidas de mutaciones se describen en detalle en las Tablas 1 y 2 del Ejemplo 1, y los mutantes adecuados incluyen los receptores β -adrenérgicos mutantes en los que los aminoácidos en la posición correspondiente se han reemplazado por otro aminoácido, típicamente el mismo aminoácido como se indica en las Tablas 1 y 2 del Ejemplo 1.

30 Los mutantes particularmente preferidos son aquellos que contienen mutaciones en los aminoácidos que corresponden al residuo de aminoácido dado por referencia al receptor β -adrenérgico de pavo: (R68S, Y227A, A282L, A334L) (véase m6-10 en la Tabla 2 siguiente); (M90V, Y227A, F338M) (véase m7-7 en la Tabla 2 siguiente); (R68S, M90V, V230A, F327A, A334L) (véase m10-8 en la Tabla 2 siguiente); y (R68S, M90V, Y227A, A282L, F327A, F338M) (véase m23 en la Tabla 2 siguiente).

Receptor de adenosina mutante

Los receptores de adenosina son bien conocidos en la técnica. Comparten homología de secuencia entre sí y se unen a la adenosina.

35 En una realización, el GPCR mutante es un receptor de adenosina mutante que, cuando se compara con la adenosina de tipo salvaje correspondiente, tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a una cualquiera o más de las siguientes posiciones según la numeración del receptor de adenosina A_{2a} humano tal como se establece en la Figura 10: Gly 114, Gly 118, Leu 167, Ala 184, Arg 199, Ala 203, Leu 208, Gln 210, Ser 213, Glu 219, Arg 220, Ser 223, Thr 224, Gln 226, Lys 227, His 230, Leu 241, Pro 260, Ser 263, Leu 267, Leu 272, Thr 279, Asn 284, Gln 311, Pro 313, Lys 315, Ala 54, Val 57, His 75, Thr 88, Gly 114, Gly 118, Thr 119, Lys 122, Gly 123, Pro 149, Glu 151, Gly 152, Ala 203, Ala 204, Ala 231, Leu 235, Val 239.

40 El receptor de adenosina mutante puede ser un mutante de cualquier receptor de adenosina humano siempre que esté mutado en una o más de las posiciones de aminoácidos, tal como se indica haciendo referencia a la secuencia de aminoácidos del receptor de adenosina A_{2a} humano dada.

45 Se prefiere particularmente que el GPCR mutante sea uno que tenga al menos un 20 % de identidad de secuencia de aminoácidos cuando se compara con la secuencia del receptor de adenosina A_{2a} humano dada, tal como se determina usando MacVector y CLUSTALW. Preferiblemente, el GPCR mutante tiene al menos un 30 % o al menos un 40 % o al menos un 50 % o al menos un 60 % de identidad de secuencia. Típicamente, hay un mayor grado de conservación de la secuencia en el sitio de unión a la adenosina.

50 Como se describe en el Ejemplo 2 a continuación, el reemplazo individual de los siguientes residuos de aminoácidos en la secuencia del receptor de adenosina A_{2a} humano (como se muestra en la Figura 10) conduce a un aumento de la termoestabilidad cuando se mide con el agonista 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA):

Gly 114, Gly 118, Leu 167, Ala 184, Arg 199, Ala 203, Leu 208, Gln 210, Ser 213, Glu 219, Arg 220, Ser 223, Thr 224, Gln 226, Lys 227, His 230, Leu 241, Pro 260, Ser 263, Leu 267, Leu 272, Thr 279, Asn 284, Gln 311, Pro 313, Lys 315.

El reemplazo de los siguientes residuos de aminoácidos en la secuencia del receptor A_{2a} humano (como se muestra en la Figura 10) conduce a un aumento de la termoestabilidad cuando se mide con el antagonista ZM 241385 (4-[2-[7-amino-2-(2-furil) [1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-il]amino]etil]fenol):

5 Ala 54, Val 57, His 75, Thr 88, Gly 114, Gly 118, Thr 119, Lys 122, Gly 123, Pro 149, Glu 151, Gly 152, Ala 203, Ala 204, Ala 231, Leu 235, Val 239.

Por lo tanto, puede usarse un receptor de adenosina A_{2a} humano mutante en el que, en comparación con su parental, uno o más de estos residuos de aminoácidos se han reemplazado por otro residuo de aminoácido. También se pueden usar receptores de adenosina mutantes en los que uno o más aminoácidos correspondientes en el receptor parental se reemplazan por otro residuo de aminoácido.

10 En una realización, el GPCR mutante es un receptor de adenosina mutante que tiene al menos un residuo de aminoácido diferente en un resto estructural en el que el receptor mutante, en comparación con su receptor parental, tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a cualquiera de las siguientes posiciones según la numeración del receptor de adenosina A_{2a} humano, tal como se establece en la Figura 10: Gly 114, Gly 118, Leu 167, Ala 184, Arg 199, Ala 203, Leu 208, Gln 210, Ser 213, Glu 219, Arg 220, Ser 223, Thr 224, Gln 226, Lys 227, His 230, 15 Leu 241, Pro 260, Ser 263, Leu 267, Leu 272, Thr 279, Asn 284, Gln 311, Pro 313, Lys 315.

Para evitar dudas, el parental puede ser un receptor de adenosina humano que tiene una secuencia de origen natural.

Por "residuo de aminoácido correspondiente" incluimos el significado del residuo de aminoácido en otro receptor de adenosina que se alinea con el residuo de aminoácido dado en el receptor de adenosina A_{2a} humano cuando se comparan el receptor de adenosina A_{2a} humano y el otro receptor de adenosina utilizando MacVector y CLUSTALW.

20 La Figura 10 muestra una alineación entre el receptor de adenosina A_{2a} humano y otros tres receptores de adenosina humanos (A_{2b}, A₃ y A₁).

Se puede observar que, por ejemplo, la Ser 115 en el receptor A_{2b} (indicado como AA2BR) corresponde a la Gly 114 en el receptor A_{2a}. De manera similar, se puede observar que la Ala 60 en el receptor A₃ (indicado como AA3R) corresponde a la Ala 54 en el receptor A_{2a}, y así sucesivamente. Otros residuos de aminoácidos correspondientes en los receptores de adenosina humanos A_{2b}, A₃ y A₁ pueden identificarse fácilmente haciendo referencia a la Figura 10.

25 Se prefiere que el aminoácido particular en el parental se reemplace por una Ala. Sin embargo, cuando el residuo de aminoácido particular en el parental es una Ala, se prefiere que se reemplace por una Leu.

30 Se prefiere que el receptor de adenosina mutante tenga un aminoácido diferente en comparación con su parental en más de una posición de aminoácido. Los receptores de adenosina A_{2b} humanos particularmente preferidos son aquellos en los que uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos se reemplazan por otro residuo de aminoácido: A55, T89, R123, L236 y V240. Típicamente, el residuo de aminoácido dado se reemplaza con Ala o Val o Met o Leu o Ile (a menos que ya sean ese residuo).

35 Se prefieren los receptores de adenosina A_{2b} humanos mutantes que tienen combinaciones de 3 o 4 o 5 mutaciones como se ha descrito anteriormente.

40 Los receptores de adenosina A₃ humanos particularmente preferidos son aquellos en los que uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos se reemplazan por otro residuo de aminoácido: A60, T94, W128, L232 y L236. Típicamente, el residuo de aminoácido dado se reemplaza con Ala o Val o Met o Leu o Ile (a menos que ya sean ese residuo).

45 Se prefieren los receptores de adenosina A₃ humanos mutantes que tienen combinaciones de 3 o 4 o 5 mutaciones como se ha descrito anteriormente.

40 Los receptores de adenosina A₁ humanos particularmente preferidos son aquellos en los que se reemplazan uno o más de los siguientes residuos: A57, T91, A125, L236 y L240. Típicamente, el residuo de aminoácido dado se reemplaza con Ala o Val o Met o Leu o Ile (a menos que ya sean ese residuo).

Las combinaciones de mutaciones particularmente preferidas se describen en detalle en el Ejemplo 2. Los mutantes adecuados incluyen estos receptores de adenosina A_{2a} humanos mutantes, y también incluyen otros receptores de adenosina mutantes en los que los aminoácidos en las posiciones correspondientes se han reemplazado por otro aminoácido, típicamente el mismo aminoácido como se indica en el Ejemplo 2.

45 Los mutantes del receptor de adenosina particularmente preferidos son aquellos que contienen mutaciones en los aminoácidos que corresponden al residuo de aminoácido dado por referencia al receptor de adenosina A_{2a} humano: (A54L, K122A, L235A) (Rant 17); (A54L, T88A, V239A, A204L) (Rant 19); y (A54L, T88A, V239A, K122A) (Rant 21).

50 Receptor de neurotensina mutante

Los receptores de neurotensina son conocidos en la técnica. Comparten homología de secuencia y se unen a la neurotensina.

- En una realización, el GPCR mutante es un receptor de neurotensina mutante que, cuando se compara con el receptor de neurotensina de tipo salvaje correspondiente, tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a una cualquiera o más de las siguientes posiciones según la numeración del receptor de neurotensina de rata tal como se establece en la Figura 11: Ala 69, Leu 72, Ala 73, Ala 86, Ala 90, Ser 100, His 103, Ser 108, Leu 109, Leu 111, Asp 113, Ile 116, Ala 120, Asp 139, Phe 147, Ala 155, Val 165, Glu 166, Lys 176, Ala 177, Thr 179, Met 181, Ser 182, Arg 183, Phe 189, Leu 205, Thr 207, Gly 209, Gly 215, Val 229, Met 250, Ile 253, Leu 256, Ile 260, Asn 262, Val 268, Asn 270, Thr 279, Met 293, Thr 294, Gly 306, Leu 308, Val 309, Leu 310, Val 313, Phe 342, Asp 345, Tyr 349, Tyr 351, Ala 356, Phe 358, Val 360, Ser 362, Asn 370, Ser 373, Phe 380, Ala 385, Cys 386, Pro 389, Gly 390, Trp 391, Arg 392, His 393, Arg 395, Lys 397, Pro 399.
- 5 Se prefiere particularmente que el GPCR mutante sea uno que tenga al menos un 20 % de identidad de secuencia de aminoácidos cuando se compara con la secuencia del receptor de neurotensina de rata dado, tal como se determina usando MacVector y CLUSTALW. Preferiblemente, el GPCR mutante tiene al menos un 30 % o al menos un 40 % o al menos un 50 % de identidad de secuencia de aminoácidos.
- 10 El receptor de neurotensina mutante puede ser un mutante de cualquier receptor de neurotensina humano siempre que esté mutado en una o más de las posiciones de aminoácidos, tal como se indica haciendo referencia a la secuencia de aminoácidos del receptor de neurotensina de rata dada.
- 15 Como se describe en el Ejemplo 3 más adelante, el reemplazo individual de los siguientes residuos de aminoácidos en la secuencia del receptor de neurotensina de rata (como se muestra en las Figuras 11 y 28) conduce a un aumento de la termoestabilidad cuando se considera con respecto a la ausencia de neurotensina. Leu 72, Ala 86, Ala 90, Ser 100, His 103, Ser 108, Leu 109, Leu 111, Asp 113, Ile 116, Ala 120, Asp 139, Phe 147, Ala 155, Lys 176, Thr 179, Met 181, Ser 182, Phe 189, Leu 205, Thr 207, Gly 209, Gly 215, Leu 256, Asn 262, Val 268, Met 293, Asp 345, Tyr 349, Tyr 351, Ala 356, Phe 358, Ser 362, Ala 385, Cys 386, Trp 391, Arg 392, His 393, Lys 397, Pro 399.
- 20 Como se describe en el Ejemplo 3 más adelante, el reemplazo individual de los siguientes residuos de aminoácidos en la secuencia del receptor de neurotensina de rata (como se muestra en las Figuras 11 y 28) conduce a un aumento de la termoestabilidad cuando se considera con respecto a la presencia de neurotensina. Ala 69, Ala 73, Ala 86, Ala 90, His 103, Val 165, Glu 166, Ala 177, Arg 183, Gly 215, Val 229, Met 250, Ile 253, Ile 260, Thr 279, Thr 294, Gly 306, Leu 308, Val 309, Leu 310, Val 313, Phe 342, Phe 358, Val 360, Ser 362, Asn 370, Ser 373, Phe 380, Ala 385, Pro 389, Gly 390, Arg 395.
- 25 Se pueden usar receptores de neurotensina humanos mutantes en los que uno o más aminoácidos correspondientes en el receptor parental se reemplazan por otro residuo de aminoácido.
- 30 En una realización, el GPCR mutante es un receptor de neurotensina mutante que tiene al menos un residuo de aminoácido diferente en un resto estructural en el que el receptor mutante, en comparación con su receptor parental, tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a cualquiera de las siguientes posiciones según la numeración del receptor de neurotensina de rata, tal como se establece en la Figura 11: Ala 69, Leu 72, Ala 73, Ala 86, Ala 90, Ser 100, His 103, Ser 108, Leu 109, Leu 111, Asp 113, Ile 116, Ala 120, Asp 139, Phe 147, Ala 155, Val 165, Glu 166, Lys 176, Ala 177, Thr 179, Met 181, Ser 182, Arg 183, Phe 189, Leu 205, Thr 207, Gly 209, Gly 215, Val 229, Met 250, Ile 253, Leu 256, Ile 260, Asn 262, Val 268, Asn 270, Thr 279, Met 293, Thr 294, Gly 306, Leu 308, Val 309, Leu 310, Val 313, Phe 342, Asp 345, Tyr 349, Tyr 351, Ala 356, Phe 358, Val 360, Ser 362, Asn 370, Ser 373, Phe 380, Ala 385, Cys 386, Pro 389, Gly 390, Trp 391, Arg 392, His 393, Arg 395, Lys 397, Pro 399.
- 35 40 Para evitar dudas, el parental puede ser un receptor de neurotensina humano que tiene una secuencia de origen natural.
- Por "residuo de aminoácido correspondiente" incluimos el significado del residuo de aminoácido en otro receptor de neurotensina que se alinea con el residuo de aminoácido dado en el receptor de neurotensina de rata cuando el receptor de neurotensina de rata y el otro receptor de neurotensina se comparan utilizando MacVector y CLUSTALW.
- 45 La Figura 11 muestra una alineación entre el receptor de neurotensina de rata y dos receptores de neurotensina humanos 1 y 2. Se puede observar, por ejemplo, que la Ala 85 del receptor 1 de neurotensina humano corresponde a la Ala 86 del receptor de neurotensina de rata, que la Phe 353 del receptor 1 de neurotensina humano corresponde a la Phe 358 del receptor de neurotensina de rata, etc. Otros residuos de aminoácidos correspondientes en los receptores de neurotensina 1 y 2 humanos pueden identificarse fácilmente haciendo referencia a la Figura 11.
- 50 55 Se prefiere que el aminoácido particular en el parental se reemplace por una Ala. Sin embargo, cuando el residuo de aminoácido particular en el parental es una Ala, se prefiere que se reemplace por una Leu.
- Se prefiere que el receptor de neurotensina mutante tenga un aminoácido diferente en comparación con su parental en más de una posición de aminoácido. Los receptores de neurotensina (NTR1) humanos particularmente preferidos son aquellos en los que uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos se reemplazan por otro residuo de aminoácido: Ala 85, His 102, Ile 259, Phe 337 y Phe 353. Típicamente, el residuo de aminoácido dado se reemplaza con Ala o Val o Met o Leu o Ile (a menos que ya sean ese residuo).
- Se prefieren los receptores de neurotensina (NTR1) humanos mutantes que tienen combinaciones de 3 o 4 o 5

mutaciones como se ha descrito anteriormente.

- Los receptores de neurotensina (NTR2) humanos particularmente preferidos son aquellos en los que uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos se reemplazan por otro residuo de aminoácido: V54, R69, T229, P331 y F347. Típicamente, el residuo de aminoácido dado se reemplaza con Ala o Val o Met o Leu o Ile (a menos que ya sean ese residuo). Se prefieren los receptores de neurotensina (NTR2) humanos mutantes que tienen combinaciones de 3 o 4 o 5 mutaciones como se ha descrito anteriormente.

Las combinaciones de mutaciones particularmente preferidas se describen en detalle en el Ejemplo 3. Los mutantes adecuados incluyen receptores de neurotensina mutantes en los que los aminoácidos en las posiciones correspondientes se han reemplazado por otro aminoácido, típicamente el mismo aminoácido como se indica en el Ejemplo 3.

- 10 Los mutantes del receptor de neurotensina particularmente preferidos son aquellos que contienen mutaciones en los residuos de aminoácidos que corresponden al residuo de aminoácido dado por referencia al receptor de neurotensina de rata: (F358A, A86L, I260A, F342A) (Nag7m); (F358A, H103A, I260A, F342A) (Nag7n).

Receptor muscarínico mutante

Los receptores muscarínicos son conocidos en la técnica. Comparten homología de secuencia y se unen a la muscarina.

- 15 Un GPCR mutante puede ser un receptor muscarínico mutante que, cuando se compara con el correspondiente receptor muscarínico de tipo salvaje, tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a una cualquiera o más de las siguientes posiciones según la numeración del receptor muscarínico M1 humano tal como se establece en la Figura 17: Leu 65, Met 145, Leu 399, Ile 383 y Met 384.

- 20 Se prefiere particularmente que el GPCR mutante sea uno que tenga al menos un 20 % de identidad de secuencia de aminoácidos cuando se compara con la secuencia del receptor muscarínico humano dada, tal como se determina usando MacVector y CLUSTALW. Preferiblemente, el GPCR mutante tiene al menos un 30 % o al menos un 40 % o al menos un 50 % de identidad de secuencia de aminoácidos.

- 25 El receptor muscarínico mutante puede ser un mutante de cualquier receptor muscarínico siempre que esté mutado en una o más de las posiciones de aminoácidos, tal como se indica haciendo referencia a la secuencia de aminoácidos del receptor muscarínico dada.

Para evitar dudas, el parental puede ser un receptor muscarínico que tiene una secuencia de origen natural, o puede ser una forma truncada o puede ser una fusión, ya sea con la proteína de origen natural o con un fragmento de la misma, o puede contener mutaciones en comparación con la secuencia de origen natural, siempre que retenga la capacidad de unión al ligando.

- 30 Un GPCR mutante puede ser un receptor muscarínico mutante. Por ejemplo, el receptor muscarínico mutante puede tener al menos un residuo de aminoácido diferente en un resto estructural en el que el receptor mutante en comparación con su receptor parental tiene un aminoácido diferente en una posición que corresponde a cualquiera de las siguientes posiciones según la numeración del receptor muscarínico humano tal como se establece en la Figura 17: Leu 65, Met 145, Leu 399, Ile 383 y Met 384.

- 35 Por "residuo de aminoácido correspondiente" incluimos el significado del residuo de aminoácido en otro receptor muscarínico que se alinea con el residuo de aminoácido dado en el receptor muscarínico humano cuando el receptor muscarínico humano y el otro receptor muscarínico se comparan utilizando MacVector y CLUSTALW.

Se prefiere que el aminoácido particular se reemplace por una Ala. Sin embargo, cuando el residuo de aminoácido particular es una Ala, se prefiere que se reemplace por una Leu.

- 40 Se prefiere que los GPCR mutantes usados en la invención tengan una mayor estabilidad frente a uno cualquiera de calor, un detergente, un agente caotrópico y un pH extremo.

Se prefiere que los GPCR mutantes usados en la invención tengan una termoestabilidad incrementada.

- 45 Se prefiere que los GPCR mutantes usados en la invención, incluidos los receptores β-adrenérgicos, de adenosina y neurotensina mutantes, tengan una mayor termoestabilidad en comparación con su parental cuando están en presencia o ausencia de un ligando del mismo. Típicamente, el ligando es un antagonista, un agonista completo, un agonista parcial o un agonista inverso, ya sea ortostérico o alostérico. Como se ha discutido anteriormente, el ligando puede ser un polipéptido, tal como un anticuerpo.

- 50 Se prefiere que los GPCR mutantes usados en la invención, por ejemplo, un receptor β-adrenérgico mutante o un receptor de adenosina mutante o un receptor de neurotensina mutante, sean al menos 2 °C más estables que su parental, preferentemente al menos 5 °C más estables, más preferentemente al menos 8 °C más estables e incluso más preferentemente al menos 10 °C o 15 °C o 20 °C más estables que su parental. Típicamente, la termoestabilidad de los receptores parentales y mutantes se mide en las mismas condiciones. Típicamente, la termoestabilidad se ensaya en una condición en la que el GPCR reside en una conformación particular. Típicamente, esta condición

seleccionada es la presencia de un ligando que se une al GPCR.

Se prefiere que los GPCR mutantes usados en la invención, cuando se solubilizan y purifican en un detergente adecuado, tengan una termoestabilidad similar a la de la rodopsina bovina purificada en dodecilmaltósido. Se prefiere particularmente que el GPCR mutante retenga al menos el 50 % de su actividad de unión al ligando después de calentarse a 40 °C durante 30 minutos. Se prefiere además que el GPCR mutante retenga al menos el 50 % de su actividad de unión al ligando después de calentarse a 55 °C durante 30 minutos.

Para evitar dudas, el GPCR mutante proporcionado en la etapa (a) del método para producir una pareja de unión de un GPCR puede extenderse o truncarse, contener delecciones o inserciones internas o alterarse de otro modo más allá de la introducción de mutaciones estabilizadoras; por ejemplo, mediante la introducción o delección de sitios para la modificación postraduccional, por ejemplo, glicosilación o fosforilación o acilación de grasas. También puede modificarse químicamente de forma sintética, por ejemplo, mediante semisíntesis de péptidos o reticulación o alquilación. En cualquier caso, el GPCR mutante proporcionado tiene una mayor estabilidad en una conformación particular en relación con su GPCR parental.

Selección de parejas de unión

Se ha demostrado anteriormente que la selección de parejas de unión contra las proteínas de membrana es una tarea difícil. La preparación del antígeno puro requerido es problemática. Las proteínas de membrana a menudo se solubilizan con detergente y se purifican como complejos proteína-detergente. El tipo y la concentración del detergente son cruciales para mantener la proteína en su conformación nativa. Algunos detergentes pueden impedir que las proteínas se unan a las superficies de plástico y poliestireno que se utilizan como soportes comunes de ELISA. Además, la adsorción a la fase sólida puede provocar la desnaturización parcial de la proteína.

Por el contrario, el aumento de la estabilidad de los GPCR mutantes confiere varias ventajas cuando los GPCR se usan como inmunógenos o reactivos de selección para el cribado, lo que permite su uso como tales en una variedad de contextos.

Por consiguiente, en una realización, el GPCR mutante puede estar en una preparación de células completas, un fragmento de membrana celular, solubilizado en detergente o puede incorporarse en una monocapa lipídica, una bicapa lipídica, una partícula lipídica unida a perlas, otra capa lipídica con soporte sólido o un proteoliposoma. Se aprecia que cuando el GPCR está inmovilizado, las capas lipídicas pueden estar soportadas directamente como una capa sobre la superficie del soporte sólido o pueden estar unidas como una capa o vesícula como se describe en Cooper M. A. J Mol Recognit. 2004 jul-ago;17(4):286-315.

Los inventores reconocen que el cribado de receptores de membrana de alto rendimiento se facilita al inmovilizar las membranas en perlas o en superficies que pueden disponerse en forma de matriz o multiplexarse de otro modo. Típicamente, las proteínas de membrana se depositan sobre una superficie junto con los lípidos en forma de proteoliposomas. Los métodos más comúnmente empleados para la formación de proteoliposomas comienzan con células procariotas o eucariotas. Las proteínas de membrana pueden aislar en una micela mixta con detergente, disolverse en un disolvente orgánico o agregarse como fragmentos de membrana mediante sonicación en tampón. Una vez aisladas y purificadas, las proteínas de membrana se pueden reconstituir en vesículas mediante: a) reconstituciones mediadas por disolventes orgánicos (por ejemplo, evaporación en fase inversa, rehidratación de películas de lípido-proteína), b) medios mecánicos (por ejemplo, sonicación, prensa francesa, congelación-descongelación) o c) medios mediados por detergentes (por ejemplo, diálisis, dilución o incorporación directa en vesículas preformadas o en bicelas).

La forma solubilizada en detergente del GPCR mutante puede ser una preparación parcialmente pura o altamente pura. La purificación, posibilitada por la mejora de la estabilidad y la optimización de las condiciones de solubilización, confiere la ventaja de eliminar los antígenos y lípidos "pegajosos" extraños y otros materiales de la superficie celular, como los carbohidratos, a los que, por ejemplo, se pueden adherir los fagos. Esto es particularmente beneficioso cuando el material "extraño" está cargado o es hidrófobo, ya que se sabe que las partículas de fagos, por ejemplo, se adhieren a superficies hidrófobas o cargadas de forma no específica. Además, ciertos anticuerpos de fagos pueden unirse por sí mismos de forma promiscua a los antígenos. Un nivel normal de pureza, según lo evaluado por SDS-PAGE, es del 80-95 %. Por lo tanto, preferiblemente, la forma solubilizada en detergente del GPCR mutante es al menos un 80 % pura, o al menos un 85 % pura, y aún más preferiblemente al menos un 90 %, o al menos un 93 %, o al menos un 95 %, pura de otras proteínas. Como es conocido en la técnica, se pueden lograr niveles más altos de pureza, por ejemplo, al menos el 99 %, usando técnicas de purificación adicionales.

Las preparaciones de receptores solubilizados se preparan típicamente en un tampón de Tris 20 mM (pH 7,0), 0,1 M (NH₄)₂SO₄, glicerol al 10 %, CHS al 0,07 %, DOM al 0,33 %, Chaps al 0,33 %, DOPC/DOPS 0,33 mM (7:3) y 1 comprimido de inhibidores de proteasas por cada 50 ml de tampón. Para los ensayos de solubilización, se añaden 0,5 ml de este tampón de solubilización a aproximadamente 2x10⁶ células, y estas suspensiones celulares se sonicán usando un sonicador de sonda (pulsos de 6x 1-s) y se colocan en un oscilador a 4 °C. Después de 2 h, las soluciones se centrifugan a 4 °C durante 20 min a 14.000 rpm usando una centrífuga de mesa. Los sobrenadantes que contienen el receptor solubilizado se transfieren luego a tubos nuevos y se mantienen congelados a -80 °C hasta su análisis.

Las preparaciones de GPCR mutantes formadas a partir de fragmentos de membrana o extractos de membrana con detergentes se revisan en detalle en Cooper M. A. J Mol Recognit. 2004 jul-ago;17(4):286-315. Son de particular interés los métodos adaptados de Graham, J. M.; Higgins, J. A. *Membrane Analysis*; Springer-Verlag: Nueva York, 1997 y Dignam, J. D. *Methods in Enzymology* 1990, 182, 194-203. Por ejemplo, un método es el siguiente:

- 5 i) Centrifugar 500 ml de un cultivo celular adecuado (por ejemplo, CHO, Sf9) a 1.000 g durante 10 min, volver a suspender el sedimento en aproximadamente el doble del volumen del sedimento de un tris-HCl 20 mM adecuado enfriado con hielo, pH 8, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, PMSF 0,1 mM, 2 µg/ml de aprotinina y 10 µg/ml de leupeptina, ii) Homogeneizar con un homogeneizador Dounce (tipo A) durante 10 ciclos y, a continuación, centrifugar a 30.000 g durante 20 min, iii) Resuspender el sedimento con 50 ml de tris HCl 20 mM, pH 8, MgCl 3 mM, 10 µg/ml de ADNAasa 10
- 10 I más PMSF, 2 µg/ml de aprotinina y 10 µg/ml de leupeptina (solución B) y volver a homogeneizar, iv) Centrifugar a 30.000 g durante 20 min y resuspender el sedimento en 20 ml de solución B y volver a homogeneizar, v) Almacenar a 4 °C para su uso inmediato después de la congelación instantánea.

El GPCR mutante puede modificarse por ingeniería para incluir una etiqueta molecular en el extremo C o el extremo N, como es bien conocido en la técnica. La etiqueta puede ser cualquiera de una etiqueta FLAG, una etiqueta His, una etiqueta c-Myc, una etiqueta DDDDK, una etiqueta HSV, una etiqueta Halo o una etiqueta de biotina. Dichas etiquetas se pueden usar para facilitar los protocolos de selección basados en fagos en solución y también se pueden usar para conferir la unión a un soporte sólido. Además, dichas etiquetas facilitarán la selección y el enriquecimiento de los GPCR mutantes a partir de preparaciones impuras utilizando columnas de afinidad, filtros de afinidad, perlas magnéticas y otros ejemplos de reactivos selectivos en soporte sólido, filtración, centrifugación, cromatografía de exclusión por tamaño y diáisisis, entre otros métodos.

La mayor estabilidad de los GPCR mutantes en un rango de detergentes y tampones de solubilización y aditivos los hace particularmente buenos para ser inmovilizados en superficies sólidas. Por lo tanto, en una realización, el GPCR mutante se inmoviliza sobre un soporte sólido. Se conocen varios soportes en la técnica e incluyen, por ejemplo, perlas, columnas, portaobjetos, chips o placas. La inmovilización puede ser mediante interacción covalente o no covalente.

- 25 25 Cuando la inmovilización se produce mediante una interacción no covalente, el soporte puede recubrirse con cualquiera de avidina, estreptavidina, un ion metálico, un anticuerpo contra el GPCR parental o un anticuerpo contra una etiqueta molecular unida al GPCR mutante. Por ejemplo, la etiqueta puede ser una reconocida por un anticuerpo, tal como una etiqueta FLAG, o puede ser una etiqueta de polihistidina que permite la unión a un ion metálico, tal como el níquel o el cobalto, como se describe, por ejemplo, en Venturi et al., Biochimica et Biophysica Acta 1610 (2003) 46-50. Alternativamente, el GPCR mutante puede modificarse químicamente, por ejemplo, con una etiqueta de biotina que puede unirse a una superficie recubierta con avidina o estreptavidina. Además, un GPCR mutante puede inmovilizarse mediante un anticuerpo generado contra la secuencia del receptor nativo.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50

Cuando la inmovilización es mediante una interacción covalente, el soporte puede recubrirse con un soporte polimérico tal como dextrano carboxilado. Por ejemplo, el GPCR mutante puede inmovilizarse covalentemente sobre una superficie recubierta con un polímero carboxilado mediante acoplamiento de amina. Por ejemplo, la activación mediada por carbodiimida soluble en agua de un soporte carboximetilado, como el dextrano o el ácido hialurónico, permite la captura covalente directa de un GPCR mutante a través de los restos amino disponibles de la proteína para formar un enlace amida estable. Alternativamente, los GPCR se pueden diseñar por ingeniería o derivatizar adicionalmente con reactivos que reaccionan con sulfidrilo (por ejemplo, piridinilditioetanamina (PDEA) o éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 3-(2-piridinilditio)propioico) (SPDP)), lo que permite la reacción con tioles de superficie libres (por ejemplo, residuos de Cys, Met libres nativos o con un residuo de Cys C-terminal diseñado por ingeniería) para formar un enlace disulfuro reversible. De manera similar, se pueden formar enlaces tioéter estables usando reactivos de acoplamiento de maleimida tales como sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (Sulfo-SMCC) y éster de N-(y-maleimidobutirloxi)sulfosuccinimida (GMBS). Un soporte sólido también puede derivatizarse con cistamina para efectuar el acoplamiento con los GPCR activados por disulfuro. Además, el tratamiento con hidrazina seguido de una aminación reductora permite el acoplamiento con aldehídos. Los grupos aldehído pueden ser nativos del receptor o formarse por oxidación leve de cualesquier *cis*-dioles presentes en el soporte sólido (presentes en los residuos de azúcar de los carbohidratos tales como dextrano, agarosa, sefarosa, ácido hialurónico y polialginato). Además de lo anterior, las superficies presentadoras de amino pueden tratarse con reactivos de unión bifuncionales disponibles comercialmente para efectuar el acoplamiento con los grupos amino o sulfidrilo libres en el receptor, tal como se describe en (Ernst, O. P. et al. *Meth. Enzymol.* 2000, 315, 471-489 y Nunomura, W.e et al. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 24540-24546).

La orientación del GPCR mutante dependerá del resultado deseado de la identificación de la pareja de unión. Por ejemplo, para la identificación de moléculas pequeñas o anticuerpos terapéuticos, el GPCR mutante se inmovilizará típicamente a través del extremo C u otro dominio intracelular para permitir que los dominios extracelulares estén orientados hacia el exterior en el ensayo. Para identificar las parejas de unión al GPCR intracelular nativas o los agentes que interfieren con la unión al GPCR, el GPCR mutante se inmoviliza típicamente por el extremo N o el dominio extracelular. La inmovilización por el extremo N o el dominio extracelular también puede identificar moléculas terapéuticas que se unen al dominio intracelular. Sin embargo, se apreciará que para que tales moléculas sean activas *in vivo*, deben poder atravesar la membrana celular.

- 60 60 En una realización alternativa, el GPCR mutante no está inmovilizado y, por ejemplo, está solubilizado en detergente o está presente en una preparación de células completas. En este caso, el compuesto de ensayo (por ejemplo, una

biblioteca de compuestos de ensayo) puede inmovilizarse sobre un soporte sólido, tal como la superficie de un chip. En la técnica se conocen diversas técnicas para inmovilizar compuestos sobre la superficie de un chip, y se puede utilizar cualquiera. Por ejemplo, las técnicas adecuadas incluyen la fotolitografía (Affymetrix, Santa Clara, Calif.), la micropunción mecánica (Schena et al., *Science* (1995) vol. 270, p. 467-470; Synteni, Fremont, Calif.) y la inyección de tinta (Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, Calif.; y Protogene, Palo Alto, Calif.). La dirección del par compuesto de ensayo/GPCR mutante en el chip se usa para revelar la identidad del compuesto de ensayo. Otros métodos adecuados se describen, por ejemplo, en Fang, Y. et al. *Drug Discovery Today* 2003, 8, 755-761, y hace referencia a Alves, I. D. et al. *Curr. Prot. & Peptide Sci.* 2005, 6, 293-312.; Barry, R. et al. *Proteomics* 2004, 4, 3717-3726.; Besenigar, M. et al. *Chem. Phys. Lipids* 2006, 141, 169-178.; Cocklin, S. et al. *Prot. Sci.* 2004, 13, 194-194.; Cooper, M. A. J. of Mol. Recognit. 2004, 17, 286-315.; Fang, Y. et al. *Drug Discov. Today* 2003, 8, 755-761.; Ferracci, G. et al. *Anal. Biochem.* 2004, 334, 367-375.; Graneli, A. et al. *Anal. Biochem.* 2007, 367, 87-94.; Graneli, A. et al. *Biosens. Bioelectron.* 2004, 20, 498-504.; Groves, J. T. *Curr. Op. Drug Discov. Develop.* 2002, 5, 606-612.; Groves, J. T. et al. *J. Immunol. Meth.* 2003, 278, 19-32.; Harding, P. J. et al. *Eur. Biophys. J. Biophys. Let.* 2006, 35, 709-712.; Komolov, K. E. et al. *Anal. Chem.* 2006, 78, 1228-1234.; Kuroda, K. et al. *App. Psychophys. Biofeedback* 2006, 31, 127-136.; Lang, M. J. et al. *Curr. Prot. Peptide Sci.* 2006, 7, 335-353.; Leifert, W. R. et al. *J. Biomol. Screening* 2005, 10, 765-779.; Martin-Garcia, J. et al. *J. Virology* 2005, 79, 6703-6713.; Minic, J. et al. *Biochim. Biophys. Acta-General Subjects* 2005, 1724, 324-332.; Mozsolits, H. et al. *J. Peptide Sci.* 2003, 9, 77-89.; Navratilova, I. et al. *Anal. Biochem.* 2006, 355, 132-139.; Ott, D. et al. *Prot. Eng. Design & Selection* 2005, 18, 153-160.; Park, P. S. H. et al. *Febs Lett.* 2004, 567, 344-348.; Sobek, J. et al. *Combinat. Chem. & High Throughput Screening* 2006, 9, 365-380.; Stenlund, P. et al. *Analytical Biochemistry* 2003, 316, 243-250.; Winter, E. M. et al. *Anal. Chem.* 2006, 78, 174-180.; Yokogawa, M. et al. *J. Am. Chem. So.* 2005, 127, 12021-12027.; Zurawski, J. A. et al. *Biopolymers* 2003, 71, 388-389.

En una realización, ni el GPCR ni el compuesto de ensayo están inmovilizados, por ejemplo, en protocolos de selección de presentación en fagos en solución.

La capacidad de producir cantidades de miligramos de GPCR purificados, estabilizados en una conformación particular, permite enfoques de cribado que no estarían disponibles para los GPCR nativos presentes en las membranas biológicas. Los ligandos de los GPCR huérfanos pueden identificarse a partir de muestras biológicas tales como sangre o extractos de tejido o de bibliotecas de ligandos. De manera similar, los ligandos de los GPCR mutantes pueden identificarse cuando los ligandos eran proteínas que interactúan, tales como proteínas accesorias. También se aprecia que los agentes terapéuticos peptídicos o proteicos pueden identificarse, al igual que los anticuerpos específicos de conformación. Por ejemplo, los anticuerpos preparados como se describe a continuación podrían evaluarse para determinar la unión al GPCR específica de conformación. En particular, los anticuerpos pueden identificarse a partir de sobrenadantes obtenidos de células B tomadas de animales inmunizados, de hibridomas obtenidos tras la inmortalización de células B del animal inmunizado o de bibliotecas de anticuerpos recombinantes que pueden expresarse en partículas de fagos o mediante un sistema de expresión in vitro, tal como la presentación en ribosomas. Se puede determinar el mecanismo de acción de los compuestos en los que el mecanismo de acción no se ha conocido previamente. Por ejemplo, una mezcla de GPCR que representa el "GPCRoma" o un subconjunto del mismo podría cribarse frente a compuestos para identificar si su mecanismo de acción era mediante la unión a un GPCR. Además, la invención puede usarse como un sistema de purificación por afinidad bioquímica en donde compuestos particulares se purifican a partir de una mezcla de compuestos.

El compuesto de ensayo se puede proporcionar como una muestra biológica. En particular, la muestra podría ser cualquier muestra adecuada tomada de un individuo. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de fluido tal como sangre, suero, plasma o líquido cefalorraquídeo. Alternativamente, la muestra podría ser un extracto de tejido o célula.

En una realización, el uno o más compuestos de ensayo son un polipéptido. Por ejemplo, el compuesto de ensayo puede ser un tipo particular de polipéptido que se sabe que se une a ciertos GPCR, pero en el que se desea la identificación de un polipéptido específico de conformación. Alternativamente, el polipéptido puede ser una molécula terapéutica candidata, por ejemplo, una anticalina (Skerra *J Biotechnol* (2001) 74(4):257-75).

En una realización, el uno o más compuestos de ensayo son un péptido.

En una realización, el uno o más compuestos de ensayo son un anticuerpo, un peptidomimético, un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico (PNA) o un aptámero, o un lípido o un carbohidrato.

En una realización, el uno o más compuestos de ensayo son una proteína de unión basada en un marco modular, tales como proteínas de repetición de anquirina, proteínas de repetición de armadillo, proteínas ricas en leucina, proteínas de repetición de tetratriópéptidos o proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin) o proteínas basadas en dominios de lipocalina o fibronectina o andamios de afilina basados en cristalina gamma humana o ubiquitina humana.

En una realización, el uno o más compuestos de ensayo son una molécula pequeña, por ejemplo, una molécula de menos de 5.000 daltons, o el uno o más compuestos de ensayo son un producto natural.

En una realización, el uno o más compuestos de ensayo son un anticuerpo. Por ejemplo, el compuesto de ensayo puede ser un anticuerpo que se ha generado contra un GPCR mutante de un GPCR parental, en donde el GPCR

mutante tiene una estabilidad aumentada en una conformación particular en relación con el GPCR parental. Preferiblemente, el GPCR mutante es el mismo GPCR mutante que se proporcionó en la etapa (a).

Tal como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, fragmentos Fab policlonales, monoclonales, químicos, monocatenarios y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab. Dichos fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos completos que retienen su actividad de unión a una sustancia diana, fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')2, así como derivados de anticuerpos modificados por ingeniería genética, tales como anticuerpos monocatenarios (scFv), proteínas de fusión, anticuerpos de dominio (dAb) y diacuerpos. Por ejemplo, se apreciará que la tecnología de ADN recombinante puede usarse para producir más anticuerpos o moléculas químicas que retengan la especificidad de unión de un anticuerpo original. Dicha tecnología puede implicar la fusión del ADN que codifica la región variable de la inmunoglobulina, o las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo con las regiones constantes, o las regiones constantes más las regiones marco de una inmunoglobulina diferente, como se describe, por ejemplo, en los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400. Además, un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo puede someterse a una mutación genética u otros cambios que pueden o no alterar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos. Por lo tanto, dado que los anticuerpos pueden modificarse de varias maneras, el término "anticuerpo" debe considerarse que abarca cualquier miembro o sustancia de unión específica que tenga un dominio de unión con la especificidad requerida. Por lo tanto, el término incluye fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión de inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por lo tanto, se incluyen moléculas químicas que comprenden un dominio de unión de inmunoglobulina, o un equivalente fusionado con otro polipéptido. Además, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanos o humanizados, como es bien conocido en la técnica.

Se pueden usar diversos procedimientos conocidos en la técnica para generar anticuerpos contra un GPCR mutante, o contra fragmentos o fusiones del mismo.

Por ejemplo, un anticuerpo contra un GPCR mutante que tenga una estabilidad aumentada en relación con un GPCR parental puede producirse inmunizando un linfocito con un inmunógeno del GPCR mutante, cribando los anticuerpos así producidos para detectar un anticuerpo que se une al GPCR y aislando el anticuerpo. Por "inmunizar un linfocito" incluimos tanto la inmunización *in vivo*, en la que se inmuniza a un animal entero, como la inmunización *in vitro*, en la que los linfocitos se inmunizan *in vitro*, por ejemplo, como se describe en el documento US 5,290,681.

Preferiblemente, el inmunógeno de un GPCR mutante es generalmente todo el GPCR mutante, pero también puede ser parte del GPCR mutante, por ejemplo, un fragmento del GPCR mutante. Por ejemplo, la producción de un GPCR estabilizado puede facilitar la identificación de una parte del GPCR que no era previamente obvia a partir de la conformación nativa y que se beneficiaría de un enfoque de inmunización dirigida. El fragmento del GPCR mutante puede ser cualquier parte del GPCR que sea capaz de incitar una respuesta inmune, tal como una respuesta de anticuerpos. Se sabe que los péptidos que tienen tan solo 5 aminoácidos pueden incitar una respuesta de anticuerpos, aunque típicamente se usan péptidos más grandes. Por lo tanto, el fragmento del inmunógeno puede tener al menos 5 aminoácidos, típicamente de 5 a 1.000 aminoácidos, tales como 5 a 500, 5 a 200, 5 a 100, 5 a 50, 5 a 40, 5 a 30, 5 a 20, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos.

Además, el inmunógeno puede ser una fusión del GPCR mutante, en donde el GPCR se fusiona con una segunda proteína que se sabe que es inmunogénica para los linfocitos. Los ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a, la hemocianina de la lapa común, la albúmina sérica, la tiroglobulina bovina y el inhibidor de la tripsina de soja. El inmunógeno también puede incluir además un adyuvante para aumentar la respuesta inmunológica a un GPCR mutante en un mamífero *in vivo*. Los diversos adyuvantes utilizados para aumentar la respuesta inmunológica incluyen, pero no se limitan a, el de Freund (completo e incompleto), los geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio), las sustancias tensioactivas (por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, dinitrofenol, etc.), los adyuvantes utilizables en seres humanos, tales como Bacilo de Calmette-Guerin y Corynebacterium parvum, o agentes inmunoestimuladores similares. Un ejemplo adicional de un adyuvante que puede emplearse incluye el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, diconinomicolato de trehalosa sintético). La elección del adyuvante puede ser importante para mantener la estructura del GPCR y, por esta razón, se prefieren particularmente Titremax y las emulsiones de aceite en agua, como la emulsión de adyuvante de Ribi. Los GPCR mutantes estabilizados también pueden unirse entre sí en una cadena principal para producir moléculas polivalentes para aumentar aún más la antigenicidad.

Se aprecia que el inmunógeno del GPCR mutante puede ser una variante del GPCR mutante, siempre que sea capaz de incitar una respuesta inmune frente al GPCR mutante y no reduzca significativamente la estabilidad del GPCR mutante. Dichas variantes incluyen polipéptidos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con el GPCR mutante, y tantas como un 5 % de sustituciones. Típicamente, las sustituciones son sustituciones conservativas en las que, por ejemplo, una "variante" se refiere a una proteína en donde en una o más posiciones se han producido inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos, conservativas o no conservativas, siempre que dichos cambios den como resultado una proteína que todavía sea capaz de incitar una respuesta inmune contra el GPCR mutante y no reduzca significativamente la estabilidad del GPCR mutante. Por "sustituciones conservativas" se entienden combinaciones tales como Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr. Dichas variantes de un GPCR mutante pueden prepararse usando métodos estándar de ingeniería de proteínas y

mutagénesis dirigida al sitio.

Se aprecia que el inmunógeno también puede ser un polinucleótido que codifica el GPCR estabilizado o un fragmento del mismo. Por ejemplo, el polinucleótido puede captarse en las células *in vivo* y expresarse en la superficie celular, donde estimulará una respuesta inmune.

5 El inmunógeno de un GPCR mutante puede proporcionarse como una preparación de células completas, en un fragmento de membrana celular, solubilizado en detergente, en una monocapa lipídica, en una bicapa lipídica, en una partícula lipídica unida a perlas, en una capa lipídica en un soporte sólido o en un proteoliposoma, como se describió anteriormente.

Para la producción de anticuerpos policlonales, se pueden inmunizar varios animales huésped adecuados (por ejemplo, conejo, cabra, pollo, ratón u otro mamífero) mediante una o más inyecciones con el inmunógeno. Las moléculas de 10 anticuerpos policlonales dirigidas contra la proteína inmunogénica pueden aislarse del mamífero (por ejemplo, del suero o la yema de huevo) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como la cromatografía de afinidad usando proteína A o proteína G, que proporcionan principalmente la fracción IgG del suero inmune.

15 Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, un hámster u otro animal huésped apropiado se inmuniza típicamente con un agente inmunizante para incitar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante.

20 En general, se usan linfocitos de sangre periférica si se desean células de origen humano, o se usan células del bazo o células de los ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) p. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas son normalmente células de mamíferos transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

25 Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficiente, soportan un alto nivel de expresión estable del anticuerpo por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son las líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. y en la American Type Culture Collection, Manassas, Va. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma humano-ratón para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., 35 Nueva York, (1987) p. 51-63).

30 Alternativamente, los anticuerpos monoclonales pueden generarse usando el "Método de Anticuerpos de Linfocitos Seleccionados" (SLAM), como se conoce bien en la técnica y se describe, por ejemplo, en Babcock *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:7843-7848. Brevemente, se identifica un único linfocito que produce un anticuerpo con una especificidad o función deseadas dentro de una gran población de células linfoides. Habitualmente, las células linfoides derivadas de una inmunización *in vivo* se criban para detectar aquellas que producen anticuerpos que se unen a antígenos seleccionados utilizando un ensayo de placa hemolítica adaptado (Jerne y Nordin, 1963, *Science*, 140:405) y la información genética que codifica la especificidad del anticuerpo se recupera posteriormente de ese linfocito.

35 Los anticuerpos monoclonales también se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Pat. de EE. UU. No. 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales producidos contra los GPCR mutantes con mayor estabilidad se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma descritas anteriormente sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que luego se transfieren en células huésped tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (Pat. de EE. UU. No. 4.816.567; Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994)) o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es una inmunoglobulina. Dicho polipéptido que no es una inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo descrito en la presente memoria, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación de antígenos de un anticuerpo descrito en la presente memoria para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

- Se apreciará que también se pueden producir anticuerpos monocatenarios específicos para los GPCR (véase, por ejemplo, la Pat. de EE. UU. No. 4.946.778). Los fragmentos de anticuerpos que contienen los idiotipos del GPCR mutante también pueden producirse mediante técnicas conocidas en la técnica incluyendo, pero no limitado a: (i) un fragmento $F_{(ab)}2$ producido por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento F_{ab} generado al reducir los puentes disulfuro de un fragmento $F_{(ab)}2$; (iii) un fragmento F_{ab} generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaina y un agente reductor, y (iv) fragmentos F_v . Una revisión general de las técnicas implicadas en la síntesis de fragmentos de anticuerpos que retienen sus sitios de unión específica se encuentra en Winter y Milstein (1991) *Nature* 349, 293-299.
- También se pueden producir anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para un GPCR mutante. La segunda diana de unión es cualquier otro antígeno y, ventajosamente, es una proteína o receptor de la superficie celular, incluida otra GPCR o subunidad del receptor. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos serían útiles para pares de GPCR que pueden formar heterodímeros (Milligan). *Biochim Biophys Acta*. 2007 abr;1768(4):825-35.). En este caso, el anticuerpo biespecífico puede dirigirse selectivamente a receptores heterodiméricos específicos. Los anticuerpos biespecíficos también pueden ser útiles para los correceptores de entrada viral en los que uno de los correceptores es un GPCR, por ejemplo, CD4 y los GPCR CCR5 o CXCR4 (Alkhatib G, Berger EA. *Eur J Med Res*. 2007 oct 15;12(9):375-84). Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se lleva a cabo normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. Procedimientos similares se divulan en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, 1991 *EMBO J.*, 10:3655-3659.
- Se aprecia que, en algunos casos, se prefiere el cribado de alto rendimiento de los compuestos de ensayo y que el método puede usarse como un método de "cribado de bibliotecas", un término bien conocido por los expertos en la técnica. Por lo tanto, el compuesto de ensayo puede ser una biblioteca de compuestos de ensayo. Por ejemplo, la biblioteca puede ser una biblioteca de péptidos o proteínas producida, por ejemplo, mediante presentación en ribosomas o una biblioteca de anticuerpos preparada *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Las metodologías para preparar y cribar dichas bibliotecas son conocidas en la técnica.
- Por lo tanto, en lugar de que el compuesto de ensayo sea un anticuerpo generado contra un GPCR mutante con mayor estabilidad en una conformación particular en relación con su GPCR parental y luego ensayar su unión a ese GPCR, el compuesto de ensayo puede ser una biblioteca de anticuerpos. Por lo tanto, otro método para generar anticuerpos específicos para un GPCR implica cribar bibliotecas de expresión que codifican genes de inmunoglobulinas, o porciones de los mismos, expresados en bacterias, levaduras, fagos filamentosos, ribosomas o subunidades ribosómicas u otros sistemas de presentación. En este método, se obtienen grandes bibliotecas de secuencias de anticuerpos o secuencias de fragmentos de anticuerpos de diversas fuentes, tales como donantes sanos, pacientes o animales (sanos o no). Estas secuencias se cloran y expresan en un sistema apropiado y los anticuerpos se seleccionan típicamente uniéndose a un GPCR con mayor estabilidad inmovilizado sobre una superficie sólida.
- Un ejemplo particular de una biblioteca de anticuerpos es una biblioteca de anticuerpos combinatoria recombinante, por ejemplo, una biblioteca de presentación en fagos de scFv o Fab, preparada usando ADNc de VL y VH humanos preparados a partir de ARNm derivado de linfocitos humanos (McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990)). Según esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se cloran en marco en un gen de proteína de la cubierta principal o menor de un bacteriófago filamento, tal como M 13 o fd, y se exponen como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamento contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en la capacidad del anticuerpo para unirse al GPCR con mayor estabilidad también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. La presentación en fagos se puede realizar en una variedad de formatos; para su revisión, véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Además, se pueden encontrar ejemplos de métodos y reactivos particularmente aptos para su uso en la generación y el cribado de bibliotecas de presentación de anticuerpos, por ejemplo, en Ladner *et al.* Pat. de EE. UU. No. 5.223.409; Kang *et al.* Publicación PCT No. WO 92/18619; Dower *et al.* Publicación PCT No. WO 91/17271; Winter *et al.* Publicación PCT No. WO 92/20791; Markland *et al.* Publicación PCT No. WO 92/15679; Breitling *et al.* Publicación PCT No. WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicación PCT No. WO 92/01047; Garrard *et al.* Publicación PCT No. WO 92/09690; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol Biol* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; y Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982.

Los métodos también pueden usarse para identificar un polinucleótido capaz de expresar una pareja de unión a un polipéptido de un GPCR, por ejemplo, como se describió anteriormente en relación con los métodos de exposición en

fagos. Se pueden ensayar alícuotas de una biblioteca de expresión en un vector adecuado para determinar la capacidad de dar el resultado requerido. Se apreciará que pueden requerirse varios ciclos de identificación de grupos de polinucleótidos que comprenden un polinucleótido que tiene la propiedad requerida y luego volver a cribar esos polinucleótidos con el fin de identificar una sola especie de polinucleótido con la propiedad requerida.

- 5 Los métodos de cribado pueden identificar fármacos o compuestos líder para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección. Se aprecia que se prefieren particularmente los ensayos de cribado que son capaces de funcionar con un alto rendimiento.

Se aprecia que, en los métodos descritos en la presente memoria, que pueden ser métodos de cribado de fármacos, un término bien conocido por los expertos en la técnica, el compuesto de ensayo puede ser un compuesto similar a un fármaco o un compuesto líder para el desarrollo de un compuesto similar a un fármaco.

10 La expresión "compuesto similar a un fármaco" es bien conocida por los expertos en la técnica y puede incluir el significado de un compuesto que tiene características que pueden hacerlo adecuado para su uso en medicina, por ejemplo, como ingrediente activo en un medicamento. Así, por ejemplo, un compuesto similar a un fármaco puede ser una molécula que puede sintetizarse mediante técnicas de química orgánica, menos preferentemente mediante 15 técnicas de biología molecular o bioquímica, y es preferentemente una molécula pequeña, que puede ser de menos de 5.000 daltons y que puede ser soluble en agua. Un compuesto similar a un fármaco puede presentar adicionalmente características de interacción selectiva con una proteína o proteínas particulares y ser biodisponible y/o capaz de penetrar las membranas celulares diana o la barrera hematoencefálica, pero se apreciará que estas características no son esenciales.

20 El término "compuesto líder" es igualmente conocido por los expertos en la técnica, y puede incluir el significado de que el compuesto, si bien no es adecuado en sí mismo para su uso como fármaco (por ejemplo, porque solo es débilmente potente contra su diana prevista, no es selectivo en su acción, es inestable, poco soluble, difícil de sintetizar o tiene poca biodisponibilidad) puede proporcionar un punto de partida para el diseño de otros compuestos que pueden tener características más deseables.

25 Por lo tanto, un método puede comprender además modificar un compuesto de ensayo que se ha mostrado que se une al GPCR mutante cuando reside en una conformación particular, y determinar si el compuesto de ensayo modificado se une al GPCR mutante cuando reside en la conformación particular. Se apreciará que se puede determinar además si el compuesto de ensayo modificado también se une al GPCR parental cuando reside en la conformación particular.

30 Se pueden usar varios métodos para determinar la unión entre un GPCR y un compuesto de ensayo incluidos, por ejemplo, los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), los ensayos de resonancia con plasmiones superficiales, los ensayos basados en chips, la inmunocitofluorescencia, la tecnología de dos híbridos de levaduras y la exposición en fagos, que son una práctica común en la técnica y se describen, por ejemplo, en Plant *et al* (1995) *Analyt Biochem*, 226(2), 342-348. y Sambrook *et al* (2001) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Tercera Edición.

35 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. Otros métodos para detectar la unión entre un compuesto de ensayo y el GPCR incluyen la ultrafiltración con métodos de espectroscopía de masas/HPLC por pulverización iónica u otros métodos físicos y analíticos. Se pueden usar métodos de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET), por ejemplo, bien conocidos por los expertos en la técnica, en los que la unión de dos entidades marcadas con fluorescencia puede medirse midiendo la interacción de las etiquetas fluorescentes 40 cuando están muy cerca una de la otra.

45 Cuando el GPCR mutante se proporciona como una preparación de células completas, un protoplasto de membrana o un proteoliposoma, se apreciará que pueden usarse técnicas biofísicas como el pinzamiento con parches, la RMN con giro en ángulo mágico, la espectroscopía de correlación de fluorescencia, la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia y la ultracentrifugación analítica para analizar la unión del GPCR mutante al compuesto de ensayo (como se describe en New, R. C., *Liposomes: a practical approach*. 1^a ed.; Oxford University Press: Oxford, 1990, y Graham, J. M.; Higgins, J. A., *Membrane Analysis*. Springer-Verlag: Nueva York, 1997.) Los métodos que permiten la determinación cuantitativa y no invasiva de la afinidad y la cinética de tales interacciones incluyen ensayos directos que permiten la monitorización continua de la unión membrana-proteína o, en algunos casos, mediante la separación ultrarrápida de los interactantes unidos y libres, seguida de la cuantificación del analito unido a la membrana y libre de membrana.

50 Se apreciará que un compuesto de ensayo unido puede detectarse usando un único marcador o etiqueta asociado con el compuesto, tal como un marcador peptídico, un marcador de ácido nucleico (Kerr *et al.*, *JACS* (1993) vol. 115, p. 2529-2531; y Brenner y Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) vol. 89, p. 5381-5383), un marcador químico (Ohlmeyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) vol. 90, p. 109222-10926; y Maclean *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) vol. 94, p. 2805-2810); un marcador fluorescente (Yamashita y Weinstock (SmithKline Beecham Corporation), WO95/32425 (1995); y Sebestyen *et al.*, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp.* 22^o 1992 (1993), p. 63-64), o una etiqueta de radiofrecuencia (Nicolau *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (1995) vol. 34, p. 2289-2291; y Moran *et al.*, *JACS* (1995) vol. 117, p. 10787-10788).

Cuando el compuesto de ensayo es un anticuerpo contra un GPCR mutante con mayor estabilidad, producido usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente, la unión se ensaya preferiblemente usando inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, en un ELISA, típicamente, el GPCR estabilizado se inmoviliza en una placa de microtitulación u otra superficie sólida. Las placas se incuban primero con BSA u otra proteína similar para bloquear los sitios de unión no específicos. Las muestras que contienen el anticuerpo (tales como suero, yema de huevo o sobrenadante de cultivo celular de hibridoma) se añaden luego a la placa y se deja que los anticuerpos se unan al GPCR inmovilizado. Los anticuerpos unidos se detectan mediante la adición de un segundo anticuerpo de detección que se une al primer anticuerpo y permite la detección mediante su conjugación con una enzima que cataliza una reacción que puede detectarse posteriormente. Además, la afinidad de unión de los anticuerpos también se puede determinar mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem, 107:220 (1980). Preferiblemente, se aislan anticuerpos que tienen un alto grado de especificidad y una alta afinidad de unión por el GPCR diana.

Se apreciará que, cuando el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal derivado de un hibridoma, los clones de hibridoma identificados como que expresan un anticuerpo específico pueden subclonarse posteriormente mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse usando métodos estándar. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, el medio de Eagle modificado por Dulbecco y el medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como ascites en un mamífero. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden entonces aislarse o purificarse adicionalmente del medio de cultivo o del fluido ascítico mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Cuando el compuesto de ensayo es una biblioteca de anticuerpos con presentación en fagos, la unión a un GPCR estabilizado se puede evaluar de la siguiente manera. Típicamente, el GPCR mutante con mayor estabilidad se utiliza para recubrir los pocillos de una placa de microtitulación durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavan en PBS y se bloquean durante 1 hora a 37 °C en MPBS (leche en polvo al 3 % en PBS). Los fagos purificados de una biblioteca de fagémidos, por ejemplo, que expresan un repertorio de scFv humano (10 unidades de transducción (tu)) se bloquean después durante 1 hora en un volumen final de 100 µl de MPBS al 3 %. Los fagos bloqueados se añaden a los pocillos de GPCR bloqueados y se incuban durante 1 hora. Los pocillos se lavan 5 veces con PBST (PBS que contiene Tween 20 al 0,1 % v/v) antes de lavarlos 5 veces con PBS. Las partículas de fago unidas se eluyen después y se usan para infectar 10 ml de *E. coli* TG1 en crecimiento exponencial. Las células infectadas se cultivan en caldo 2TY durante 1 hora a 37 °C, luego se extienden sobre placas 2TYAG y se incuban durante la noche a 30 °C. Los cultivos de esta primera ronda de reconocimiento y selección se superinfectan con fagos auxiliares y se rescatan para dar, por ejemplo, partículas de fago que expresan el anticuerpo scFv para la segunda ronda de reconocimiento y selección.

Un ensayo de unión alternativo para los anticuerpos de presentación en fagos incluye el uso de selecciones solubles que utilizan la proteína GPCR mutante biotinilada a una concentración final típicamente de 100 nM. En este caso, el fago scFv purificado (1.012 tu) de una biblioteca de fagémidos scFv (como se describió anteriormente) se suspende en 1 ml de MPBS al 3 % y se bloquea durante 30 minutos. A continuación, se añade el GPCR biotinilado y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora. Los complejos fago/antígeno se añaden posteriormente a 250 µl de perlas magnéticas de estreptavidina Dynal M280 que se han bloqueado durante 1 hora a 37 °C en 1 ml de MPBS al 3 %, y se incuban con las perlas durante 15 minutos más a temperatura ambiente. Las perlas se capturan usando una rejilla magnética y se lavan 4 veces en 1 ml de MPBS al 3 % /Tween 20 al 0,1 % (v/v), seguido de 3 lavados en PBS. Tras el último lavado con PBS, las perlas se resuspenden en 100 µl de PBS y se utilizan para infectar 5 ml de *E. coli* en crecimiento exponencial. De nuevo, los cultivos de esta primera ronda de selección soluble se superinfectarían con fagos auxiliares y se rescatarían para dar partículas de fago que expresan el anticuerpo scFv para una segunda ronda de selección soluble.

Se aprecia que los ensayos de cribado que son capaces de funcionar con un alto rendimiento son particularmente preferidos para determinar la unión a un GPCR mutante, por ejemplo, los ensayos basados en chips. Los GPCR mutantes estabilizados son particularmente adecuados para dichos ensayos, a diferencia de sus GPCR parentales, que no son lo suficientemente estables cuando se purifican para usarse en estos formatos. En particular, la tecnología denominada VLSIPS™ ha permitido la producción de chips extremadamente pequeños que contienen cientos de miles o más de sondas moleculares diferentes, es decir, los compuestos de ensayo. Estos chips biológicos tienen sondas dispuestas en matrices, a cada sonda se le asigna una ubicación específica. Se han producido chips biológicos en los que cada ubicación tiene una escala de, por ejemplo, diez micrómetros. Los chips se pueden usar para determinar si las moléculas diana interactúan con alguna de las sondas del chip. Después de exponer la matriz a las moléculas diana en las condiciones de ensayo seleccionadas, los dispositivos de escaneo pueden examinar cada ubicación en la matriz y determinar si una molécula diana ha interactuado con la sonda en esa ubicación.

Un compuesto de ensayo para un GPCR mutante en la superficie de un chip puede detectarse escaneando la superficie del chip en busca de radiactividad o fluorescencia. La dirección del par, que interactúa en el chip revela la identidad del compuesto de ensayo o, si hay una matriz de GPCR mutantes en el chip, la identidad del receptor (véase, por ejemplo, Kuimelis et al., Addressable Protein Arrays, U.S. Ser. No. 60/080.686, 3 de abril de 1998, ahora abandonado, y U.S. Ser. No. 09/282.734, 31 de marzo de 1999). En el último caso, la matriz de GPCR mutantes puede usarse como método para obtener datos de selectividad sobre compuestos para diversas conformaciones del mismo

GPCR o para varios GPCR.

Los métodos alternativos para detectar la unión de un GPCR mutante a un compuesto de ensayo, por ejemplo, ADN, ARN, proteínas y fosfolípidos, moléculas pequeñas y productos naturales incluyen ensayos de resonancia de plasmiones superficiales (SPA), por ejemplo, como se describe en Plant *et al* (2005) *Analyt Biochem* **226**(2), 342-348.

- 5 El GPCR mutante, inmovilizado en una perla de SPA, puede incubarse con un único ligando que está marcado, por ejemplo, con un grupo fluorescente o el ligando puede ser un radioligando. La capacidad de un compuesto de ensayo para unirse al GPCR mutante puede determinarse entonces mediante su capacidad para desplazar el ligando fluorescente o el radioligando. En otro ejemplo, el GPCR mutante se inmoviliza en la superficie de un chip y la unión de los compuestos de ensayo se detecta mediante resonancia de plasmiones superficiales y técnicas relacionadas que emplean ondas evanescentes. Los cambios en el índice de refracción se pueden usar para determinar la cantidad de compuesto unido, la afinidad de la interacción y la cinética de asociación y disociación. Se ha descrito un ejemplo de este enfoque para la rodopsina que se inmovilizó sobre superficies de dextrano carboxilado modificadas con grupos alquilo largos. Tras el acoplamiento con aminas del receptor solubilizado con detergente, las micelas de mezcla de lípido/detergente se adhirieron sobre la superficie inmovilizada. El detergente se eluyó en el flujo de tampón posterior y el lípido remanente formó una bicapa en la superficie del chip. (Karlsson OP, Lofas S. *Anal Biochem*. 2002 ene; 15;300(2): 132-8).

Cuando el compuesto de ensayo es un péptido o una proteína, por ejemplo, un ligando para un receptor huérfano o una proteína que interactúa, el ligando unido puede eluirse y luego identificarse mediante espectrometría de masas, tal como la espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) o la espectrometría de masas por ionización por electropulverización (ESI-MS) (Williams C, Addona TA. *Trends Biotechnol*. 2000 feb;18(2):45, Williams C. *Curr Opin Biotechnol*. 2000 feb;11(1):42-6). El GPCR mutante puede inmovilizarse en una columna o perla, o expresarse en forma etiquetada en una célula y copurificarse con el ligando de dichas mezclas complejas usando reactivos dirigidos a la etiqueta o directamente al GPCR (Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B. *Nat Biotechnol*. 1999 oct; 17(10): 1030-2).

- 20 25 La capacidad de generar parejas de unión específicas de conformación de alta afinidad para los GPCR facilitará la producción de parejas de unión de GPCR terapéuticas. Por lo tanto, se apreciará que, además de establecer la unión a un GPCR, también será deseable determinar el efecto funcional de una pareja de unión sobre el GPCR.

Por consiguiente, un método puede comprender además determinar si la pareja de unión afecta a la función del GPCR al que se une y aislar un compuesto de ensayo que afecta a la función del GPCR.

- 30 35 40 Una pareja de unión puede disminuir la unión entre el GPCR y su ligando. Por ejemplo, la pareja de unión puede disminuir la unión en un factor de al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 250 veces, 500 veces o 1.000 veces. Preferiblemente, la pareja de unión reduce la unión en un factor de entre 100-1.000 veces, tal como entre 10-100 veces.

45 Una pareja de unión puede aumentar la unión entre el GPCR y su ligando. Por ejemplo, la pareja de unión puede aumentar la unión en un factor de al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 250 veces, 500 veces o 1.000 veces. Preferiblemente, la pareja de unión aumenta la unión en un factor de entre 100-1.000 veces, tal como entre 10-100 veces.

Se puede determinar si la pareja de unión modula la activación de un GPCR.

- 50 55 En este ensayo, el GPCR parental o el GPCR mutante estabilizado se expresa *in vivo*, por ejemplo, en células de mamíferos o insectos en las que se permite que el GPCR se acople a vías de transducción de señales del GPCR bien conocidas (Eglen R.M. Functional G protein-coupled receptor assays for primary and secondary screening. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2005 jun;8(4):311-8). Dichos ensayos incluyen: movilización del calcio (Gonzalez JE, Maher MP. Cellular fluorescent indicators and voltage/ion probe reader (VIPR) tools for ion channel and receptor drug discovery. *Receptors Channels*. 2002; 8(5-6):283-95, Dupriez VJ, Maes K, Le Poul E, Burgeon E, Detheux M. Aequorin-based functional assays for G-protein-coupled receptors, ion channels, and tyrosine kinase receptors. *Receptors Channels*. 2002; 8(5-6):319-30), cambios en los niveles de AMPc (Weber M, Ferrer M, Zheng W, Inglese J, Strulovici B, Kunapuli P.A. 1536-well cAMP assay for Gs- and Gi-coupled receptors using enzyme fragmentation complementation. *Assay Drug Dev Technol*. 2004 feb;2(1):39-49.), activación de las vías de quinasas (Leroy D,

Missotten M, Waltzinger C, Martin T, Scheer A.G protein-coupled receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation: towards a generic sensor of GPCR activation. *J Recept Signal Transduct Res.* 2007;27(1):83-97), regulación de la transcripción génica, por ejemplo, mediante el uso de un gen informador (Liu B, Wu D. Analysis of the coupling of G12/13 to G protein-coupled receptors using a luciferase reporter assay. *Methods Mol Biol.* 2004;237:145-9, Kent TC, Thompson KS, Naylor LH. Development of a generic dual-reporter gene assay for screening G-protein-coupled receptors *J Biomol Screen.* 2005 ago;10(5):437-46), reclutamiento de β-arrestina (Hudson CC, Oakley RH, Sjaastad MD, Loomis CR. High-content screening of known G protein-coupled receptors by arrestin translocation *Methods Enzymol.* 2006;414:63-78), la activación de proteínas G, tal como la medición de la actividad de la GTPasa (Jameson EE, Roof RA, Whorton MR, Mosberg HI, Sunahara RK, Neubig RR, Kennedy RT. Real-time detection of basal and stimulated G protein GTPase activity using fluorescent GTP analogues. *J Biol Chem.* 2005 mar 4; 280(9):7712-9) o medir la unión de [³⁵S] GTPgamma(y)S (Rodgers G, Hubert C, McKinzie J, Suter T, Statnick M, Emmerson P, Stancato L. Development of displacement binding and GTPgammaS scintillation proximity assays for the identification of antagonists of the micro-opioid receptor. *Assay Drug Dev Technol.* 2003 oct;1(5):627-36).

Típicamente, se seleccionan parejas de unión que modulan la activación del receptor.

- 15 Para las parejas de unión agonistas, la pareja de unión mimetizará típicamente la actividad del ligando natural del receptor y producirá un aumento en la activación del receptor, la activación de la proteína G o la transducción de señales. Esto ocurrirá en ausencia de un agonista adicional. Una pareja de unión agonista puede aumentar la activación del receptor en un factor de al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 250 veces, 500 veces, 1.000 veces o 10.000 veces.
- 20 Se apreciará que hay dos maneras en las que una pareja de unión puede aumentar la activación del receptor. Por ejemplo, la pareja de unión puede actuar como un agonista directo, en cuyo caso la activación del receptor se incrementa típicamente entre 2-1.000 veces. En otro método, la pareja de unión puede actuar para amplificar la actividad de un agonista. Por ejemplo, la pareja de unión puede aumentar la potencia del agonista, en cuyo caso la activación del receptor se incrementa típicamente entre 2-1.000 veces, tal como entre 10-100 veces, o la pareja de unión puede aumentar la respuesta máxima producida por el agonista, en cuyo caso la activación del receptor se incrementa típicamente entre 2-10 veces. Se apreciará que la activación/amplificación de la actividad de los receptores que ya están activados por el ligando endógeno puede ser preferible a activar todos los receptores disponibles, ya que fisiológicamente es más específico y puede mitigar problemas tales como la desensibilización y los efectos secundarios indeseables (Christopoulos A (2002) *Nat Rev Drug Discov* 1:198-210).
- 25 30 En el caso de parejas de unión antagonistas, la pareja de unión actuará típicamente para bloquear la actividad del receptor o su activación por un agonista. La pareja de unión antagonista puede hacer esto bloqueando la unión del agonista o bloqueando el receptor en una forma inactiva de tal manera que no puede acoplarse a las proteínas G. Una pareja de unión antagonista puede disminuir la activación del receptor en un factor de al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 250 veces, 500 veces, 1.000 veces o 10.000 veces. Típicamente, una pareja de unión antagonista reduciría la activación del receptor a un nivel no detectable.

35 Se apreciará que puede ser deseable producir un compuesto de ensayo o una combinación de compuestos de ensayo que se unan a más de un GPCR. Por ejemplo, el compuesto de ensayo puede unirse a más de un GPCR de la misma clase de familia. La Unión Internacional de Farmacología ha elaborado una lista de clases y familias de GPCRA (Foord et al (2005) *Pharmacol. Rev.* 57, 279-288) y esta lista se actualiza periódicamente en <http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorFamiliesForward>. El compuesto de ensayo puede unirse a un GPCR diana y al menos a un GPCR adicional. El al menos un GPCR adicional puede ser un GPCR que se ha implicado en una ruta patológica, o un GPCR que está implicado en la misma ruta de señalización que el GPCR diana, por ejemplo, una ruta de señalización que regula o modula una ruta patológica. Además, el al menos un GPCR adicional puede ser uno que mejore o suprima la acción de un compuesto de ensayo sobre el GPCR diana. Dicha mejora o supresión de la acción se puede determinar usando métodos bien conocidos en la técnica incluidos los ensayos de unión y los ensayos funcionales tal como se ha descrito, por ejemplo, anteriormente.

- 40 45 50 Por lo tanto, se puede seleccionar un compuesto de ensayo que se una a un primer y un segundo GPCR, donde el primer y el segundo GPCR pueden ser cualquier par de GPCR. Por ejemplo, el método puede usarse para seleccionar una pareja bivalente que se una a los GPCR que forman un heterodímero, en cuyo caso la pareja bivalente podría unirse a ambos receptores al mismo tiempo. Los ejemplos de heterodímeros de GPCR apropiados en este contexto incluyen dopamina D1 y adenosina A1, heterodímeros de los receptores de opioides, receptores de cannabinoides CB1 y orexina (Marshall, FH. Heterodimerization of G-protein-coupled receptors in the CNS. *Curr Opin Pharmacol.* 2001 feb;1(1):40-4; Kent T, McAlpine C, Sabetnia S, Presland J. G-protein-coupled receptor heterodimerization: assay technologies to clinical significance. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2007 sep;10(5):580-9). Además, podría seleccionarse una pareja de unión que se una y module la actividad de dos receptores independientes con el fin de mejorar la actividad terapéutica. Por ejemplo, CCK1/péptidos del receptor opioide se unen tanto a CCK1 como al receptor opioide (García-López MT, González-Muñiz R, Martín-Martínez M, Herranz R. Strategies for design of non peptide CCK1R agonist/antagonist ligands. *Curr Top Med Chem.* 2007;7(12):1180-94). Otros ejemplos apropiados incluyen un agonista beta 2 y un antagonista muscarínico combinados; un antagonista de dopamina D2 y un antagonista de 5HT2; un antagonista de D2 y un antagonista de 5HT6; y un agonista de M1 y un antagonista de 5HT6.

Se apreciará que más de un GPCR proporcionado en la etapa (a) puede o no residir en la misma conformación. Por ejemplo, un diacuerpo o pareja de unión bivalente similar puede agonizar en un extremo de la molécula y antagonizar en el otro extremo, en cuyo caso los GPCR no tendrían que residir en la misma conformación.

5 Típicamente, cuando se selecciona un compuesto de ensayo que se une a más de un GPCR, el compuesto de ensayo se une a cada GPCR con una potencia similar. Típicamente, los valores de K_d para la unión de pareja de unión particular a cada uno de los GPCR respectivos están dentro de 5-10 veces entre sí, tal como dentro de 2-3 veces.

Se apreciará que los métodos pueden permitir aislar combinaciones de compuestos de ensayo que se unen a uno o más GPCR, ya sea repitiendo el método con compuestos de ensayo individuales, proporcionando múltiples compuestos de ensayo en un ciclo del método o usando una biblioteca de compuestos de ensayo en el método.

10 Una pareja de unión puede ser una pareja de unión específica de conformación, como se describió anteriormente.

La pareja de unión puede ser cualquiera de un polipéptido; un anticalina; un péptido; un anticuerpo químico; un anticuerpo monocatenario; un aptámero; una darpina; un fragmento de anticuerpo Fab, F(ab')₂, Fv, scFv o dAb; una molécula pequeña; un producto natural; un aficuerpo; un peptidomimético; un ácido nucleico; una molécula de ácido nucleico peptídico; un lípido; un carbohidrato; una proteína basada en un marco modular incluyendo proteínas de repetición de anquirina, proteínas de repetición de armadillo, proteínas ricas en leucina, proteínas de repetición de tetratiopéptidos o proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin); o proteínas basadas en dominios de lipocalina o fibronectina o andamios de afilina basados en cristalina gamma humana o ubiquitina humana.

15 Una pareja de unión puede ser un anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser específico para un epítopo no contiguo en el GPCR o puede ser específico para un epítopo contiguo en el GPCR. Preferiblemente, los epítopos relevantes en el GPCR parental y mutante reconocidos por el anticuerpo son similares, ya sean contiguos o no contiguos. Específicamente, los epítopos extracelulares tales como los extremos C o N o los bucles polipeptídicos del GPCR parental y el mutante son preferiblemente similares.

20 Típicamente, la pareja de unión para el GPCR mutante tiene una potencia similar a su unión al GPCR parental. Típicamente, los valores de K_d para la pareja de unión particular que se une al GPCR mutante y al GPCR parental están dentro de 5-10 veces entre sí, tal como dentro de 2-3 veces. Típicamente, la unión de la pareja de unión al GPCR mutante en comparación con el GPCR parental no sería más de 5 veces más débil ni más de 10 veces más fuerte.

25 Típicamente, los receptores mutantes que se han estabilizado en la conformación seleccionada deberían unirse a la pareja de unión seleccionada con una afinidad aproximadamente igual (es decir, típicamente dentro de 2-3 veces) o una afinidad mayor que la del receptor parental. Para las parejas de unión con conformación agonista, los mutantes típicamente se unen a los agonistas con la misma o mayor afinidad que el GPCR parental y típicamente se unen a los antagonistas con la misma o menor afinidad que el GPCR parental. De manera similar, para las parejas de unión con conformación antagonista, los mutantes típicamente se unen a los antagonistas con la misma o mayor afinidad que el GPCR parental y típicamente se unen a los agonistas con la misma o menor afinidad que el GPCR parental.

30 Se aprecia que los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse como un biosensor para detectar sustancias diana tales como moléculas, especialmente biomoléculas. Por ejemplo, el biosensor puede usarse para detectar biomarcadores de enfermedades o tratamientos farmacológicos que pueden usarse como diagnóstico o pronóstico. El GPCR mutante puede inmovilizarse en la superficie de un sensor y la unión de los compuestos puede detectarse, por ejemplo, mediante resonancia de plasmones superficiales como se describió anteriormente. En otro ejemplo de un biosensor, la unión del compuesto al receptor puede detectarse mediante cambios en la fluorescencia intrínseca del triptófano o utilizando la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia entre un donante residente en triptófano intrínseco y un acceptor fluorescente (Lakowicz JR 1999. Principles of fluorescence spectroscopy, Plenum Nueva York, Martin DD, Budamagunta MS, Ryan RO, Voss JC, Oda MN. J Biol Chem. 2006 jul 21;281(29):20418-26). Alternativamente, los GPCR mutantes pueden usarse en biosensores acústicos, en donde los GPCR mutantes se inmovilizan en sensores resonadores de cristal de cuarzo (QCRS) y la respuesta del sensor acústico se utiliza para detectar las interacciones de unión compuesto - GPCR mutante (Cooper MA, Drug Discov Today. 2006 dic; 11(23-24): 1068-74. Epub 2006 oct 20).

35 Por consiguiente, un aspecto de la invención proporciona un biosensor que comprende un GPCR mutante de un GPCR humano de tipo salvaje en donde el GPCR mutante tiene una termoestabilidad conformacional aumentada en una conformación particular en relación con el GPCR humano de tipo salvaje, y en donde cuando una sustancia diana se une a dicho GPCR mutante, se produce una señal detectable.

40 Las preferencias por los GPCR mutantes son las definidas anteriormente con respecto al método de producción de una pareja de unión de un GPCR.

45 Preferiblemente, el biosensor está en forma de chip o en una forma soportada en perlas, donde los GPCR mutantes se inmovilizan en un chip o perla y se usan para detectar sustancias diana. Sin embargo, se apreciará que los GPCR mutantes pueden proporcionarse en forma soluble, en cuyo caso el biosensor comprendería una solución.

50 La inmovilización de los GPCR mutantes en un soporte sólido para su incorporación en un biosensor se puede realizar

usando métodos bien conocidos en la técnica y como se describió anteriormente con respecto al método de producción de una pareja de unión de un GPCR. Típicamente, los GPCR mutantes se reconstituyen en superficies de chips adecuadas para el análisis directo de biosensores mediante la reconstitución de la superficie mediada por flujo (Karlsson et al., Analytical Biochemistry 300, 132-138 (2002)). Por ejemplo, se puede lograr una rápida inmovilización y reconstitución de los GPCR en superficies de dextrano carboxilado modificadas con grupos alquilo largos tras el acoplamiento con aminas de un receptor solubilizado con detergente; las micelas mixtas de lípido/detergente se adhieren a medida que se inyectan sobre la superficie inmovilizada, aprovechando las celdas de flujo integradas presentes en muchos sistemas de biosensores. A continuación, el detergente se puede eluir en el flujo de tampón posterior dejando los GPCR mutantes intactos y funcionales para su posterior cribado y análisis. Dichas preparaciones de GPCR mutantes que contienen detergente son idealmente aptas para su uso en un biosensor basado en el flujo, tal como un biosensor de microbalanzas de cristal de cuarzo, un biosensor de ondas evanescentes, un biosensor de guía de ondas planas, un sensor Raman de superficie o un biosensor de resonancia de plasmón superficial. En el último caso, los receptores solubilizados se pueden capturar en un chip sensor de dextrano CM4 o CM5 de GE Healthcare (Biacore). La matriz de dextrano del chip sensor se activa con 35 μ L de *N*-hidroxisuccinimida 50 mM y *N*-etyl-*N*-(dimetilamino)propil]carbodiimida 200 mM a un caudal de 5 μ L/min, seguido de una inyección de 7 min de 0,1 mg/ml de receptor GPCR solubilizado en detergente (por ejemplo, con CHAPS 25 mM en MOPS 10 mM, pH 7,5). Cualesquier grupos carboxi reactivos remanentes se desactivan usando un pulso de 7 min de hidrocloruro de etanolamina 1 M, pH 8,5. Tras la inyección, el chip biosensor se lava a un caudal elevado con la solución de operación de resonancia de plasmones superficiales hasta que se restablezca una línea base estable (aprox. 30 min). Esta etapa de lavado funciona como un procedimiento de diálsis de flujo y asegura la eliminación del detergente de la superficie del chip sensor; sin embargo, se apreciará que las partes hidrófobas del GPCR aún pueden estar unidas a algunas moléculas de lípidos o detergentes para mantener la integridad funcional.

La sustancia diana puede ser cualquiera de un péptido, una proteína, un carbohidrato, un lípido, un ligando del GPCR, una molécula sintética, un fármaco, un metabolito del fármaco o un biomarcador de enfermedad.

En una realización, la señal detectable es cualquiera de un cambio de color; fluorescencia; evanescencia; resonancia de plasmones superficiales; conductancia eléctrica o separación de cargas; absorción ultravioleta, visible o infrarroja; luminiscencia; quimioluminiscencia; electroquimioluminiscencia; anisotropía de fluorescencia; intensidad de fluorescencia; vida útil de la fluorescencia; polarización de fluorescencia; transferencia de energía de fluorescencia; masa molecular; resonancia de espín electrónico; resonancia magnética nuclear; volumen o radio hidrodinámico; gravedad específica; centelleo; resistencia al efecto de campo; impedancia eléctrica; impedancia acústica; evanescencia cuántica; dispersión resonante; apantallamiento fluorescente; espectroscopía de correlación de fluorescencia; carga acústica; velocidad de onda cortante acústica; fuerza de unión; o tensión interfacial.

La invención se describirá ahora con más detalle con respecto a las siguientes Figuras y Ejemplos en donde:

Figura 1 Cambios de aminoácidos en β AR que conducen a la termoestabilidad. El cociente de estabilidad indica el % de actividad de unión remanente de los mutantes después de calentar la muestra durante 30 min a 32 °C. Todos los valores se normalizan a β AR₃₄₋₄₂₄ (50 %, mostrado como una línea discontinua) para eliminar cualquier variabilidad experimental entre los ensayos. Las barras muestran la estabilidad de cada mutante. Las letras en el eje x indican el aminoácido presente en el mutante. El aminoácido original y su posición en β AR₃₄₋₄₂₄ se indica a continuación. Las barras correspondientes al mismo aminoácido en β AR₃₄₋₄₂₄ son del mismo color con flechas que indican las mejores mutaciones. Los errores se calcularon a partir de mediciones duplicadas; los mejores mutantes se volvieron a ensayar posteriormente para determinar la Tm de cada mutación individual y para proporcionar un orden de rango preciso de estabilidad para cada mutante (véase el Ejemplo 1).

Figura 2 Cadenas laterales de la rodopsina que se encuentran en posiciones equivalentes a las mutaciones termoestables en β AR₃₄₋₄₂₄. Los residuos de aminoácidos equivalentes en la rodopsina a los residuos de aminoácidos mutados en β AR₃₄₋₄₂₄ se localizaron en la estructura de la rodopsina, basándose en una alineación entre la rodopsina, el receptor $\beta 1$ adrenérgico, el receptor de neurotensina y el receptor de adenosina A_{2a} (datos no mostrados). Las cadenas laterales de la misma hélice transmembrana se muestran como modelos de llenado de espacios en el mismo color. El nombre y la posición de los residuos de aminoácidos son los de la rodopsina.

Figura 3 Evolución de la termoestabilidad en β AR. A partir del β AR-m10-8, las combinaciones de mutaciones se reorganizaron sistemáticamente para encontrar la combinación óptima de mutaciones (véase también la Tabla 2).

Figura 4 Estabilidad de β AR-m23 y de β AR₃₄₋₄₂₄ en el estado apo o que contienen el antagonista unido [³H]-DHA. Para determinar la Tm en ausencia de ligando (estado apo, líneas discontinuas), los receptores solubilizados con detergente se incubaron durante 30 minutos a las temperaturas indicadas antes de llevar a cabo el ensayo de unión. Para la determinación de la Tm de la forma unida al antagonista (líneas continuas), los receptores solubilizados con detergente se preincubaron con [³H]-DHA, seguido de incubación a las temperaturas indicadas. β AR-m23 (círculos) y β AR₃₄₋₄₂₄ (cuadrados). Los puntos de datos provienen de mediciones duplicadas en un experimento representativo.

Figura 5 Unión competitiva de agonistas a β AR-m23 y β AR₃₄₋₄₂₄. Los ensayos de unión se realizaron en receptores parcialmente purificados en DDM; β AR-m23 (triángulos) y β AR₃₄₋₄₂₄ (cuadrados). Se usó [³H]-DHA a una concentración tres veces mayor que la K_D del receptor parcialmente purificado (ver Métodos). La unión de [³H]-DHA

se compitió con concentraciones crecientes de los agonistas, norepinefrina (a) e isoprenalina (b), o con un antagonista, alprenolol (c). Los valores de logCE₅₀ y los correspondientes valores de CE₅₀ para los diferentes ligandos se calcularon mediante regresión no lineal utilizando el software GraphPad Prism y el error para los logCE₅₀ fue inferior al 10 %. Las CE₅₀ para la unión del ligando a βAR₃₄₋₄₂₄ y βAR-m23 son: norepinefrina, βAR₃₄₋₄₂₄ 1,5 μM, βAR-m23 3,7 mM; isoprenalina, βAR₃₄₋₄₂₄ 330 nM, βAR-m23 20 μM; alprenolol, βAR 78 nM, βAR-m23 112 nM.

Figura 6 Estabilidad de βAR-m23 y βAR₃₄₋₄₂₄ en cinco detergentes diferentes. Las muestras de βAR₃₄₋₄₂₄ (a) y βAR-m23 (b) solubilizadas en DDM se purificaron parcialmente en columnas de agarosa de Ni-NTA, lo que permitió su intercambio en varios detergentes diferentes: DDM (cuadrados), DM (triángulos), OG (triángulos invertidos), LDAO (diamantes) y NG (círculos). El βAR es tan inestable en OG, NG y LDAO que no fue posible medir ninguna actividad después de la purificación a 6 °C. Los ensayos se llevaron a cabo como se describe en los Métodos y la Tm se muestra en la intersección entre las curvas y la línea discontinua. Los resultados provienen de mediciones duplicadas en un experimento representativo realizado en paralelo. (c) Microfotografía de un cristal del mutante βAR-m23, que mostró un buen orden por difracción de rayos X.

Figura 7 Curva de termoestabilidad del βAR₃₄₋₄₂₄ (Tm). Los ensayos de unión se realizaron usando [³H]-dihidroalprenolol (DHA) como radioligando como se describe en "Métodos". Las muestras se calentaron durante 30 minutos a diferentes temperaturas antes del ensayo. Tm representa la temperatura a la que la unión disminuyó hasta el 50 %, valor mostrado como una línea discontinua. Los puntos de datos provienen de duplicados de un solo experimento. Este experimento se ha repetido varias veces con resultados similares.

Figura 8 Ensayos de unión por saturación de membranas de βAR₃₄₋₄₂₄ y βAR-m23. Los ensayos de unión se realizaron como se describe en "Métodos" utilizando [³H]-dihidroalprenolol (DHA) como radioligando; βAR₃₄₋₄₂₄ (a) y βAR-m23 (b). Los gráficos de Scatchard se muestran como recuadros junto con los valores correspondientes para B_{máx} y K_D. Los puntos de datos provienen de duplicados de dos experimentos independientes para cada proteína. Los datos se analizaron mediante regresión no lineal utilizando el software Prism (GraphPad).

Figura 9 Alineación del receptor β-adrenérgico de pavo con los receptores β1, β2 y β3 humanos.

Figura 10 Alineación de los receptores de adenosina humanos.

Figura 11 Alineación de los receptores de neurotensina.

Figura 12 Diagrama de flujo que muestra los dos formatos de ensayo diferentes de ligando (+) y ligando (-) utilizados para determinar la termoestabilidad del receptor.

Figura 13 Perfil farmacológico del receptor de adenosina A_{2a} mutante termoestable, Rant21. Unión por saturación del antagonista (A) y del agonista (B) a los receptores solubilizados. (C-F) Inhibición de la unión de [³H]ZM241385 al aumentar las concentraciones de los antagonistas (C) XAC y (D) Teofilina, y de los agonistas (E) NECA y (F) R-PIA; la unión de [³H]ZM241385 (10 nM) en ausencia de ligando no marcado se estableció en el 100 %. Cada receptor solubilizado se incubó con ligandos durante una hora en hielo en un tampón de unión (Tris 50 mM, pH 7,5 y DDM al 0,025 %) que contenía NaCl 400 mM (A, C-F). Los datos mostrados provienen de dos experimentos independientes con cada punto de datos medido por triplicado. Los valores de K_D y K_i se muestran en la Tabla (iii).

Figura 14 Los mutantes termoestables muestran una dependencia disminuida de lípidos (A) y un aumento de la supervivencia a una mayor concentración de DDM (B) tras el calentamiento en comparación con el receptor de tipo salvaje. Los receptores se solubilizaron en DDM al 1 % (diluido en Tris 50 mM pH 7,5 y NaCl 400 mM) y se inmovilizaron en agarosa Ni-NTA para la etapa de IMAC. El intercambio del tampón que contenía la concentración apropiada de DDM y/o lípidos se realizó durante los lavados y la elución de las perlas de Ni-NTA.

Figura 15 El mapeo de las mutaciones M90V, Y227A, A282L y F338M m23 en el receptor adrenérgico beta1 de pavo en residuos homólogos (M82, Y219, C265 y A321, respectivamente) en la estructura del receptor beta2 adrenérgico humano (Rasmussen *et al* (2007) *Nature* 15; 383-387; código de acceso pdb 2R4R y 2R4S) revela su posición en una interfaz helicoidal y en una torsión helicoidal, respectivamente. Los residuos de aminoácidos en posiciones equivalentes a las mutaciones termoestabilizadoras en el receptor β1 adrenérgico de pavo se muestran como modelos de llenado de espacios etiquetados.

Figura 16 Mapeo de las mutaciones m23 en el receptor beta1 adrenérgico de pavo sobre residuos homólogos en la estructura del receptor beta2 adrenérgico humano (Cherezov *et al* (2007) *Science*, 318:1258-65; código de acceso pdb 2RH1). La traza de Cα del β2AR se muestra con el resto de fusión (lisozima T4) eliminado. Las seis mutaciones en βAR-m23 (R68S, M90V, Y227A, A282L, F327A, F338M) son equivalentes a los residuos de aminoácidos K60, M82, Y219, C265, L310, F321 en el β2AR humano. La Lys60 está en el extremo intracelular de la Hélice 1 y apunta a la interfaz lípido-agua. La Met82 está cerca del centro de la Hélice 2 y apunta al bolsillo de unión del ligando; la distancia más cercana entre el sustrato carazolol y la cadena lateral de Met es de 5,7 Å. La Tyr219 está hacia el extremo intracelular de la hélice 5 y está en la interfaz hélice 5-hélice 6. La Cys265 está al final de la región del bucle entre las hélices 5 y 6 y apunta hacia fuera de las regiones transmembrana. Tanto Leu310 como Phe321 están en la hélice 7 y ambos apuntan hacia la bicapa lipídica.

Figura 17 Alineación de secuencias múltiples de los receptores beta-2AR humano, NTR1 de rata, beta-1 AR de pavo, adenosina A_{2a}R humana y muscarínico M1 humano. En cada secuencia, las mutaciones termoestabilizadoras se marcan con un recuadro. Las mutaciones que ocurren en dos o más secuencias se indican con una estrella.

Figura 18 Mapeo de la mutación I55A de beta1AR de pavo (I47 de beta2AR humano) en la estructura de beta2AR humano (código de acceso pdb 2RH1). La mutación se produce en la interfaz entre 3 hélices (H1, torsión H2, torsión H7). Izquierda: vista lateral; derecha: vista superior.

Figura 19 Mapeo de la mutación V89L de beta1AR de pavo (V81 de beta2AR humano) en la estructura de beta2AR humano (código de acceso pdb 2RH1). La mutación está en la torsión de la hélice 2. Las hélices están numeradas y el antagonista unido se muestra como un modelo de llenado de espacio. Los residuos de aminoácidos en posiciones equivalentes a las mutaciones termoestabilizadoras en el receptor $\beta 1$ adrenérgico de pavo se muestran como modelos de llenado de espacios y están indicados con flechas para claridad. Izquierda: vista lateral; derecha: vista superior.

Figura 20 Mapeo de la mutación M90V de beta1AR de pavo (M82 de beta2AR humano) en la estructura de beta2AR humano (código de acceso pdb 2RH1). La mutación está en la torsión de la hélice 2 orientada hacia el bolsillo de unión. Las hélices están numeradas y el antagonista unido se muestra como un modelo de llenado de espacio. Los residuos de aminoácidos en posiciones equivalentes a las mutaciones termoestabilizadoras en el receptor $\beta 1$ adrenérgico de pavo se muestran como modelos de llenado de espacios y están indicados con flechas para claridad. Izquierda: vista lateral; derecha: vista superior.

Figura 21 Mapeo de la mutación I129V de beta1AR de pavo (I121 de beta2AR humano) en la estructura de beta2AR humano (código de acceso pdb 2RH1). La mutación se encuentra opuesta a una torsión en la hélice 5. Las hélices están numeradas y el antagonista unido se muestra como un modelo de llenado de espacio. Los residuos de aminoácidos en posiciones equivalentes a las mutaciones termoestabilizadoras en el receptor $\beta 1$ adrenérgico de pavo se muestran como modelos de llenado de espacios y están indicados con flechas para claridad. Izquierda: vista lateral; derecha: vista inferior.

Figura 22 Mapeo de la mutación F338M de beta1AR de pavo (F321 de beta2AR humano) en la estructura de beta2AR humano (código de acceso pdb 2RH1). La mutación está en la torsión en la hélice 7. Las hélices están numeradas y el antagonista unido se muestra como un modelo de llenado de espacio. Los residuos de aminoácidos en posiciones equivalentes a las mutaciones termoestabilizadoras en el receptor $\beta 1$ adrenérgico de pavo se muestran como modelos de llenado de espacios y están indicados con flechas para claridad. Izquierda: vista lateral; derecha: vista superior.

Figura 23 Mapeo de la mutación Y227A de beta1AR de pavo (Y219 de beta2AR humano) en la estructura de beta2AR humano (código de acceso pdb 2RH1). La mutación está en la interfaz hélice-hélice. Las hélices están numeradas y el antagonista unido se muestra como un modelo de llenado de espacio. Los residuos de aminoácidos en posiciones equivalentes a las mutaciones termoestabilizadoras en el receptor $\beta 1$ adrenérgico de pavo se muestran como modelos de llenado de espacios y están indicados con flechas para claridad. Izquierda: vista lateral; derecha: vista inferior.

Figura 24 Mapeo de la mutación A282L de beta1AR de pavo (C265 de beta2AR humano) en la estructura de beta2AR humano (código de acceso pdb 2RH1). La mutación está en la región del bucle. Las hélices están numeradas y el antagonista unido se muestra como un modelo de llenado de espacio. Los residuos de aminoácidos en posiciones equivalentes a las mutaciones termoestabilizadoras en el receptor $\beta 1$ adrenérgico de pavo se muestran como modelos de llenado de espacios y están indicados con flechas para claridad. Izquierda: vista lateral; derecha: vista superior.

Figura 25 Mapeo de la mutación R68S de beta1AR de pavo (K60 de beta2AR humano) en la estructura de beta2AR humano (código de acceso pdb 2RH1). La mutación se encuentra en el límite lípido-agua, apuntando al disolvente. Las hélices están numeradas y el antagonista unido se muestra como un modelo de llenado de espacio. Los residuos de aminoácidos en posiciones equivalentes a las mutaciones termoestabilizadoras en el receptor $\beta 1$ adrenérgico de pavo se muestran como modelos de llenado de espacios y están indicados con flechas para claridad. Izquierda: vista lateral; derecha: vista superior en ángulo.

Figura 26 Comparación de las termoestabilidades de tres receptores β adrenérgicos ($\beta 1$ de pavo (■), $\beta 1$ humano (▼) y $\beta 2$ humano (●)) y dos receptores termoestabilizados ($\beta 1$ -m23 de pavo (▲) y $\beta 2$ -m23 humano (◆)). Las seis mutaciones termoestabilizadoras en $\beta 1$ -m23 (R68S, M90V, Y227A, A282L, F327A, F338M) se transfirieron todas directamente al receptor $\beta 2$ humano (K60S, M82V, Y219A, C265L, L310A, F321M), produciendo $\beta 2$ -m23, según la alineación de la Figura 9. Los mutantes resultantes se expresaron transitoriamente en células de mamíferos, se solubilizaron en dodecilmaltósido al 0,1 % y se ensayaron para determinar la termoestabilidad en el formato menos ligando (calentando el estado apo, inactivando en hielo, añadiendo 3H-DHA). Las Tm aparentes para $\beta 1$ y $\beta 2$ -m23 de pavo fueron de 23 °C y 45 °C respectivamente, lo que arroja un ΔT_m de 22 °C, como se observó anteriormente en el receptor expresado en *E. coli*. Las Tm para $\beta 2$ y $\beta 2$ -m23 humanos fueron de 29 °C y 41 °C respectivamente, lo que muestra que el receptor apo se estabilizó en 12 °C. Esto ejemplifica el principio de la transferibilidad de las mutaciones termoestabilizadoras de un receptor a otro receptor, que en este caso son idénticas en un 59 %. El receptor $\beta 1$ humano

($T_m \sim 12^\circ C$) es mucho menos estable que el receptor $\beta 1$ de pavo.

Figura 27 Porcentaje de identidad del receptor $\beta 1$ de pavo, el receptor de adenosina humana y el receptor de neurotensina de rata con los receptores adrenérgicos β adrenérgico humanos, los receptores de adenosina humanos y los receptores de neurotensina humanos, respectivamente.

5 **Figura 28** Alineación de los receptores de neurotensina.

Figura 29 Representación esquemática del proceso típico de aislamiento líder para la identificación de ligantes scFv inhibidores.

Figura 30 Resultados de los ELISA de fagos policloniales (A) y monoclonales (B). (B) Se usaron las columnas 1-9, filas A-H de una placa de ELISA de 96 pocillos para cribar 69 clones de fagos anti β -AR.

10 **Figura 31** ELISA de fagos de especificidad utilizando el receptor β -adrenérgico y 3 proteínas de control no relacionadas (CD86-CD4, Notch1-Fc y la región NRR de Notch1). Se muestran las proteínas recubiertas en dos placas de ELISA, la placa amino (A) y la placa His (B). Los nombres de los clones de fagos beta-AR (barras rayadas) de izquierda a derecha (C1, E2, A3, G3, C4, D4, F4, H4, D5, F5, G5, C6, D6, C7, F7, B8 y C8) provienen del cribado que se muestra en la Figura 30. En el gráfico, los clones anti- β -AR pegajosos se indican con sus nombres de clon sobre la barra correspondiente. También se muestra la unión de poblaciones de fagos de control específicas a las proteínas de control, el anti-CD86 (barras grises), el anti-N1 EGF (barras blancas) y el anti-N1 NRR (barras punteadas).

15 **Figura 32** Se muestran los clones de anticuerpos anti- β -AR (barras blancas) y un anticuerpo de control positivo (barra negra) y un control negativo sin anticuerpos (barra negra).

20 **Figura 33** Dos etapas de captura del $\beta 1$ AR biotinilado en una celda de flujo recubierta de estreptavidina. A ~ 1.200 RU capturadas; B ~ 4.000 RU capturadas.

25 **Figura 34** Respuestas de Biacore para el alprenolol. La concentración más alta es de 666 nM y cada concentración se ensayó tres veces en una serie de diluciones de tres veces. Las respuestas dependen de la concentración y son bastante reproducibles. Las líneas representan el ajuste de un modelo simple de interacción 1:1 y los parámetros determinados a partir de este ajuste se enumeran en el recuadro (el número entre paréntesis es el error en el último dígito).

Figura 35 Respuestas normalizadas al alprenolol. Las respuestas se normalizan con respecto a la Rmáx determinada (a partir del ajuste) para cada curva.

Figura 36 Respuestas de Biacore para el propranolol. La concentración más alta es de 111 nM y cada concentración se ensayó dos o tres veces en una serie de diluciones de tres veces.

30 **Figura 37** Respuestas normalizadas al propranolol. Las respuestas se normalizan con respecto a la Rmáx determinada (a partir del ajuste) para cada curva.

Figura 38 Respuestas de Biacore al alprenolol en una superficie de $\beta 1$ AR que tenía casi tres días.

Figura 39 Captura de $\beta 1$ AR a una densidad de 8.000 RU.

Figura 40 Respuesta de Biacore a la unión del alprenolol a la superficie de 8.000 RU $\beta 1$ AR.

35 **Figura 41** Respuestas de Biacore al salmeterol usando 2 superficies diferentes. El salmeterol se ensayó usando una concentración máxima de 1,67 um, y cada concentración se ensayó dos o tres veces. A. Superficie de 4.200 RU; B. Superficie de 8.000 RU. Se observan respuestas más grandes con la superficie de 8.000 RU.

Figura 42 Respuestas de Biacore para el salmeterol, mostradas como respuestas normalizadas. A. Superficie de 4.200 RU; B. Superficie de 8.000 RU.

40 **Figura 43** Respuestas de Biacore al isoproterenol. El isoproterenol se ensayó usando una concentración máxima de 2 μ M. A. Superficie 4.200 RU. B. Superficie de 8.000 RU.

Figura 44 Respuestas de Biacore para el carvedilol. A. Superficie de 5.200 RU; B. Superficie de 8.000 RU.

Figura 45 Curvas de unión competitiva a una variedad de compuestos ensayados para determinar su actividad en el receptor de adenosina A_{2a} estabilizado (Rant22) usando [3 H]ZM241385.

45 **Ejemplo 1: Estabilización conformacional del receptor β -adrenérgico en forma resistente a los detergentes**

Resumen

Hay más de 500 receptores acoplados a la proteína G (GPCR) no odorantes codificados por el genoma humano, muchos de los cuales se prevé que sean posibles dianas terapéuticas, pero solo hay una estructura disponible, la de

la rodopsina bovina, que representa a toda la familia. Hay muchas razones para la falta de progreso en la determinación de la estructura del GPCR, pero planteamos la hipótesis de que mejorar la estabilidad de estos receptores frente al detergente y, al mismo tiempo, bloquearlos en una conformación preferida mejorará en gran medida las posibilidades de cristalización. Se desarrolló una estrategia genérica para el aislamiento de mutantes termoestables solubilizados en detergente de un GPCR, el receptor β -adrenérgico, basada en la mutagénesis por barrido de alanina seguida de un ensayo de estabilidad del receptor. De los 318 mutantes ensayados, 15 mostraron un aumento mensurable de la estabilidad. Tras la optimización del residuo de aminoácido en el sitio de cada mutación inicial, se construyó un receptor óptimamente estable mediante la combinación de mutaciones específicas. El receptor mutante más estable, β AR-m23, contenía 6 mutaciones puntuales que condujeron a una T_m 21 °C más alta que la proteína nativa y, en presencia de un antagonista unido, β ARm23 era tan estable como la rodopsina bovina. Además, β AR-m23 era significativamente más estable en una amplia gama de detergentes ideales para la cristalización y tenía preferentemente una conformación antagonista en ausencia de ligando.

Resultados

Selección de mutaciones únicas que aumentan la termoestabilidad del receptor β 1 adrenérgico

El β AR de los eritrocitos de pavo es una diana ideal para los estudios estructurales porque está bien caracterizado y se expresa en niveles altos en las células de los insectos usando el sistema de expresión de baculovirus [10,11]. La mejor sobreexpresión de β AR se obtiene utilizando una versión truncada del receptor que contiene los residuos 34-424 (β AR₃₄₋₄₂₄) [9] y esta se utilizó como punto de partida para este trabajo. La mutagénesis por barrido de alanina se utilizó para definir los residuos de aminoácidos en β AR₃₄₋₄₂₄ que, cuando mutaban, alteraban la termoestabilidad del receptor; si había una alanina presente en la secuencia, se mutaba en un residuo de leucina. Se realizaron un total de 318 mutaciones en los residuos de aminoácidos 37-369, una región que abarca los siete dominios transmembrana y 23 residuos de aminoácidos en el extremo C; no se obtuvieron mutaciones en 15 residuos de aminoácidos debido a la fuerte estructura secundaria en el molde de ADN. Después de secuenciar cada mutante para garantizar la presencia solo de la mutación deseada, los receptores se expresaron funcionalmente en *E. coli* y se ensayaron para determinar su estabilidad.

El ensayo de termoestabilidad se realizó en receptores solubilizados en detergente no purificados calentando los receptores a 32 °C durante 30 minutos, inactivando la reacción en hielo y, a continuación, realizando un ensayo de unión a radioligando, utilizando el antagonista [³H]-dihidroalprenolol, para determinar el número de moléculas de β AR₃₄₋₄₂₄ funcionales remanentes en comparación con el control sin calentar. El calentamiento del β AR₃₄₋₄₂₄ no mutado a 32 °C durante 30 min antes del ensayo redujo la unión a aproximadamente el 50 % del control sin calentar (Fig. 7); todos los datos de los mutantes se normalizaron mediante la inclusión de β AR₃₄₋₄₂₄ no mutado como control en cada ensayo realizado. En la primera ronda de cribado, dieciocho mutantes mostraron un aumento aparente en la estabilidad, manteniendo más del 75 % de la unión al antagonista después del calentamiento y expresándose en *E. coli* a al menos el 50 % de los niveles de β AR₃₄₋₄₂₄ nativo. En vista de la posibilidad de aumentar aún más la estabilidad de estos mutantes, cada uno de los 18 residuos se mutó a 2-5 residuos de aminoácidos alternativos de tamaño o carga variables (Fig. 1). De estos 18 mutantes, 12 no mejoraron con cambios adicionales, 5 tuvieron una mejor termoestabilidad si estaba presente otro aminoácido y una mutación del primer cribado resultó ser un falso positivo. Además, tres residuos que no se estabilizaron tras la mutación a alanina (V89, S151, L221) se mutaron a una variedad de otros residuos de aminoácidos; las dos posiciones que, cuando mutaron a alanina, no afectaron a la termoestabilidad, tampoco se vieron afectadas por otros cambios. Por el contrario, V89 mostró menos termoestabilidad cuando mutó a alanina, pero la termoestabilidad aumentó cuando se mutó a Leu. Por lo tanto, el escaneo inicial de alanina arrojó con éxito dos tercios de los mejores residuos de aminoácidos de los ensayados para cualquier posición dada.

La posición y el entorno pronosticados para cada uno de los 16 residuos de aminoácidos que proporcionaron los mejores aumentos en la termoestabilidad cuando mutaron se determinaron alineando la secuencia de β AR con la de la rodopsina, cuya estructura se conoce (Fig. 2). Se predijo que catorce de estos residuos estarían presentes en las hélices o transmembrana, y que cinco de los residuos estarían orientados hacia los lípidos, 4 estarían profundamente enterrados y el resto se predijo que estaría en las interfaces entre las hélices. Se esperaría que algunos de estos residuos interactuaran entre sí en la estructura del β AR, como los aminoácidos consecutivos G67 y R68 (V63 y Q64 en la rodopsina), o los aminoácidos del grupo Y227, R229, V230 y A234 en la hélice 5 (Y223, Q225, L226 y V230 en la rodopsina). Otros residuos de aminoácidos que podrían interactuar en el β AR fueron Q194A en el bucle externo 2 y D322A en el bucle externo 3 (G182 y P285 en la rodopsina, respectivamente).

El aumento de estabilidad que cada mutación individual dio al β AR₃₄₋₄₂₄ se determinó midiendo la T_m para cada mutante (los resultados no se muestran); en este contexto, la T_m es la temperatura que produjo una disminución del 50 % en la unión funcional después de calentar el receptor durante 30 minutos. Cada mutación aumentó la T_m del β AR₃₄₋₄₂₄ entre 1 y 3 °C, con la excepción de M90A e Y227A, que aumentaron la T_m en 8 °C.

Combinación de mutaciones para crear un receptor óptimamente estable

Inicialmente, se combinaron las mutaciones que mejoraban la termoestabilidad que estaban adyacentes entre sí en la secuencia de aminoácidos primaria del β AR. Se expresaron y ensayaron las construcciones que contenían las mutaciones G67A y R68S, o diferentes combinaciones de las mutaciones al final de la hélice 5 (Y227A, R229Q, V230A

y A234L); los valores de Tm (resultados no mostrados) fueron solo 1-3 °C más altos que la Tm del β AR₃₄₋₄₂₄ y un mutante era en realidad un poco menos estable, lo que sugiere que la combinación de mutaciones adyacentes entre sí en la secuencia de aminoácidos primaria no mejora en gran medida la termoestabilidad. Posteriormente, se combinaron las mutaciones que se preveía distantes entre sí en la estructura. Las reacciones de PCR se realizaron usando varias mezclas de cebadores para combinar hasta 5 mutaciones diferentes de manera aleatoria y luego se ensayaron para determinar la termoestabilidad (Tabla 1). La mejor de estas combinaciones aumentó la Tm en más de 10 °C en comparación con la Tm del β AR₃₄₋₄₂₄. En algunos casos, hubo un claro efecto aditivo sobre la Tm con la incorporación secuencial de mutaciones individuales. Esto se observa en una serie de 3 mutantes, m4-1, m4-7 y m4-2, con la adición de V230A a m4-1 aumentando la Tm en 2 °C y la mutación adicional D332A en m4-7 aumentando la Tm en 3 °C más. Todos los mutantes que contenían Y227A y M90A mostraron un aumento en la Tm de 10 °C o más. Solo estas dos mutaciones juntas aumentaron la Tm del β AR₃₄₋₄₂₄ en 13 °C (m7-5); sin embargo, la unión total del antagonista fue inferior al 50 % del β AR₃₄₋₄₂₄, lo que sugiere una alteración de la expresión de este mutante. La adición de F338M a m7-5 no aumentó la termoestabilidad, pero aumentó los niveles de expresión funcional en *E. coli*.

Tabla 1. Combinaciones de mutaciones por PCR. Se realizaron 10 reacciones de PCR combinando diferentes pares de cebadores que contenían las mutaciones seleccionadas. Las reacciones de PCR exitosas se muestran en la tabla. La estabilidad de estos nuevos mutantes se ensayó como se describe en la Figura 7 y se calculó la Tm. Los resultados se muestran como la media ± S.E. de duplicados.

PCR	Receptor	Mutaciones	T _m (°C)
	β AR ₃₄₋₄₂₄		31,7±0,1
4	m4-1	G67A, G98A	35,5±0,9
	m4-2	G67A, G98A, V230A, D322A	40,9±0,9
	m4-6	G98A, D322A	35,0±0,2
	m4-7	G67A, G98A, V230A	38,0±1,2
6	m6-1	Y227A, A234L, A282L, A334L	41,6±0,9
	m6-4	R68S, Y227A, A234L, A282L	41,6±0,1
	m6-5	R68S, A234L, A282L, A334L	41,9±0,5
	m6-9	R68S, Y227A, A234L, A282L, A334L	43,7±0,4
	m6-10	R68S, Y227A, A282L, A334L	47,4±1,1
	m6-11	R68S, A282L, A334L	39,1±0,5
7	m7-1	M90V, A282L, F338M	43,0±0,8
	m7-2	M90V, A282L	38,9±0,6
	m7-5	M90V, Y227A	45,2±1,0
	m7-6	M90V, I129V	40,0±0,6
	m7-7	M90V, Y227A, F338M	45,2±2,0
10	m10-4	R68S, M90V, V230A, A334L	46,9±1,0
	m10-8	R68S, M90V, V230A, F327A, A334L	47,3±1,4

Los mutantes más termoestables obtenidos, que aún se expresaban en niveles altos en *E. coli*, eran m6-10, m7-7 y m10-8. Estos mutantes contenían colectivamente un total de 10 mutaciones diferentes, produciéndose 8 mutaciones en al menos dos de los mutantes. Se realizó una segunda ronda de mutagénesis utilizando m10-8 como molde y añadiendo o reemplazando las mutaciones presentes en m6-10 y m7-7 (Fig. 3); algunas de estas mutaciones estaban muy cerca en la secuencia de aminoácidos primaria de β AR y, por lo tanto, no eran aditivas, como se indicó anteriormente, pero muchas mutaciones mejoraron aún más la Tm (Tabla 2). Por ejemplo, el intercambio de dos mutaciones en m10-8, para crear m18, elevó la Tm a 49,6 °C y la adición de A282L para hacer m23 aumentó la Tm 3 °C más hasta 52,8 °C. Esto produjo el mutante de β AR₃₄₋₄₂₄ más termoestable hasta el momento y se denominará β AR-m23.

Tabla 2. Mejora de la mejor combinación de mutaciones. Estos nuevos mutantes se obtuvieron mezclando los cambios presentes en los mutantes m6-10, m7-7 y m10-8 mediante PCR. La estabilidad de estos nuevos mutantes se ensayó como se describe en la Figura 7 y se calculó la Tm. Los resultados se muestran como la media ± S.E. de duplicados.

	Mutaciones							T _m (°C)	
m17	R68S	M90V	Y227A	V230A	-	F327A	A334L	-	48,2±1,4
m18	R68S	M90V	Y227A	V230A	A282L	F327A	-	F338M	49,6±0/9
m19	R68S	M90V	Y227A	-	A282L	F327A	-	F338M	49,0±0,8
m20	R68S	M90V	-	-	-	F327A	A334L	-	48,4±0,7
m21	R68S	M90V	Y227A	-	-	F327A	A334L	-	47,0±1,3
m22	R68S	M90V	Y227A			F327A	A334L	-	47,4±0,5
m23	R68S	M90V	Y227A	-	A282L	F327A	-	F338M	52,8±1,4

5 Los ensayos de termoestabilidad utilizados para desarrollar los mutantes de β AR₃₄₋₄₂₄ se realizaron calentando el receptor en ausencia del antagonista, pero es bien sabido que el ligando unido estabiliza los receptores. Por lo tanto, los ensayos de estabilidad para β AR₃₄₋₄₂₄ y β AR-m23 se repitieron con el antagonista unido a los receptores durante la etapa de calentamiento (Fig. 4). Como era de esperar, la Tm del receptor que contenía el antagonista unido durante la incubación fue mayor que la del receptor sin antagonista. Para β AR₃₄₋₄₂₄, la Tm fue 6 °C más alta con el antagonista unido y para β AR-m23, la Tm aumentó 2 °C hasta 55 °C; el menor aumento de la termoestabilidad observado para β AR-m23 cuando el antagonista se une sugiere que el receptor ya se encuentra en una conformación más estable similar al estado de unión al antagonista que el β AR₃₄₋₄₂₄ (ver también más abajo). La Tm del β AR-m23 con antagonista unido es muy similar a la Tm de la rodopsina en estado oscuro en dodecilmaltósido (DDM) [12], cuya estructura ha sido resuelta por dos laboratorios independientes [13,14]. Esto sugirió que β AR-m23 es lo suficientemente estable para la cristalización.

Caracterización de β AR-m23

Las tres actividades características medidas para β AR-m23 y β AR₃₄₋₄₂₄ para identificar el efecto de las seis mutaciones fueron la afinidad de la unión a los antagonistas, las eficacias relativas de la unión a los agonistas y la capacidad de β AR-m23 para acoplarse a las proteínas G. Los experimentos de unión por saturación a membranas usando el antagonista [³H]-dihidroalprenolol (Figura 8) mostraron que la afinidad de unión a β AR-m23 (K_D 6,5 ± 0,2 nM, n = 2) era ligeramente inferior que para β AR₃₄₋₄₂₄ (K_D 2,8 ± 0,1 nM, n = 2), lo que sugiere que no hay grandes perturbaciones en la estructura de β AR-m23 en la conformación unida al antagonista. Esto concuerda con la observación de que ninguna de las mutaciones en β AR-m23 se corresponde con los aminoácidos que se cree que están implicados en la unión del ligando. A diferencia de la unión al antagonista, la eficacia de la unión al agonista de β AR-m23 es 3 órdenes de magnitud más débil que para β AR₃₄₋₄₂₄ (Fig. 5). La potencia del agonista isoprenalina es consistentemente inferior en β AR-m23 y β AR₃₄₋₄₂₄ que para el agonista nativo norepinefrina, lo que indica que es probable que la conformación unida al agonista de los dos receptores sea similar. Sin embargo, la gran disminución de la eficacia del agonista en β AR-m23 en comparación con β AR₃₄₋₄₂₄ indica que las 6 mutaciones en β AR-m23 han bloqueado el receptor preferentemente en una conformación unida al antagonista. Desde la perspectiva de la cristalización, esto es una ventaja adicional para la termoestabilización, porque es esencial tener una población de proteínas conformacionalmente homogénea para la producción de cristales con calidad de difracción.

Todos los ensayos de termoestabilidad utilizados para obtener β AR-m23 se realizaron en receptores solubilizados en DDM. El objetivo del proceso de termoestabilización era producir un receptor que fuera ideal para la cristalográfia, lo que significa que fuera estable en una variedad de detergentes diferentes y no solo en DDM. Por lo tanto, ensayamos la estabilidad de β AR-m23 y β AR en una variedad de detergentes diferentes, concentrándonos en detergentes pequeños que se utilizan preferentemente para cristalizar proteínas de membrana integrales. Se solubilizaron membranas preparadas a partir de *E. coli* que expresaban β AR-m23 o β AR₃₄₋₄₂₄ en DDM, se unieron a agarosa Ni-NTA y luego se lavaron con DDM, decilmaltósido (DM), octilglucósido (OG), óxido de laurildimetilamina (LDAO) o nonilglucósido (NG). Se realizaron ensayos de estabilidad en los receptores de cada uno de los diferentes detergentes (Fig. 6). El β AR₃₄₋₄₂₄ solo fue estable en DDM y DM, sin que ningún receptor activo se eluyera de la resina lavada con OG, NG o LDAO. Por el contrario, el β AR-m23 funcional todavía estaba presente en todos los detergentes y se pudo determinar la Tm. Como era de esperar, los detergentes más pequeños eran considerablemente más desnaturalizantes que el DDM (Tm 52 °C) o el DM (Tm 48 °C), con T_m de 25 °C (NG), 23 °C (LDAO) y 17 °C (OG). La diferencia de Tm entre β AR-m23 y β AR₃₄₋₄₂₄ es de aproximadamente 20 °C, independientemente de si los receptores se solubilizaron en DDM o DM; por lo tanto, no es sorprendente que no se pueda encontrar ningún β AR₃₄₋₄₂₄ activo, ni siquiera en NG, ya que la Tm prevista, sería de aproximadamente 5 °C, lo que provocaría una rápida inactivación del receptor en las condiciones utilizadas para la purificación. La estrategia de selección utilizada para la generación de β AR-m23 se eligió deliberadamente para que se basara en la termoestabilidad, porque es mucho más sencilla de aplicar que la selección por motivos de estabilidad en detergentes de dureza creciente. Sin embargo, está claro que

el aumento de la termoestabilidad de β AR₃₄₋₄₂₄ también condujo a un aumento de la tolerancia a los detergentes pequeños ideales para cristalizar las proteínas integrales de la membrana.

Cristalización del GPCR mutante

Los intentos anteriores de cristalizar varias construcciones diferentes del receptor beta-adrenérgico de pavo fracasaron. A pesar de experimentar con una variedad de condiciones, utilizando tanto la secuencia nativa como varias construcciones truncadas y con bucle eliminado, durante muchos años, no se obtuvieron cristales.

Sin embargo, una vez que las mutaciones estabilizadoras del β AR-m23 se transfirieron a las construcciones, se obtuvieron varios cristales diferentes en diferentes detergentes y en diferentes condiciones.

Los cristales que se han estudiado más hasta ahora se obtuvieron utilizando la construcción beta-36 purificada (residuos de aminoácidos 34-367 del receptor beta de pavo que contiene los siguientes cambios: mutaciones puntuales C116L y C358A; las 6 mutaciones puntuales termoestabilizadoras en m23; el reemplazo de los residuos de aminoácidos 244-278 por la secuencia ASKRK; una etiqueta His6 C terminal) expresada en células de insectos usando el sistema de expresión de baculovirus, tras transferir el receptor al detergente octil-tioglucósido. El precipitante usado fue PEG600 o PEG1000 y los cristales obtenidos son placas alargadas.

También se han llevado a cabo experimentos para ver si, una vez definidas las condiciones de cristalización usando el receptor estabilizado, era posible obtener cristales usando la construcción original no estabilizada. Era posible que se pudieran haber obtenido cristales similares o quizás muy pequeños, pero, de hecho, el "tipo salvaje" (es decir, la estructura de partida a partir de la cual comenzó la mutagénesis) nunca dio ningún cristal.

Los cristales tienen forma de placa con el grupo espacial C2 y se difractan bien, aunque las dimensiones de las celdas varían dependiendo de las condiciones de congelación utilizadas.

En general, una vez que se ha estabilizado un GPCR, puede someterse a una variedad de técnicas bien conocidas para la determinación de la estructura. La técnica más común para cristalizar proteínas de membrana es mediante difusión de vapor (20, 21), normalmente utilizando inicialmente unos pocos miles de condiciones de cristalización establecidas usando dispositivos robóticos comerciales (22). Sin embargo, a veces los cristales formados por difusión de vapor son pequeños y desordenados, por lo que pueden emplearse entonces técnicas adicionales. Una técnica implica la cocristalización (por difusión de vapor) de la proteína de membrana con anticuerpos que se unen específicamente a los epítopos conformacionales de la superficie de las proteínas (23, 24); esto aumenta la superficie hidrófila de la proteína y puede formar fuertes contactos cristalinos. Una segunda alternativa es usar una matriz de cristalización diferente que comúnmente se denomina fase cúbica lipídica o mesofase lipídica (25, 26), que también se ha desarrollado en una plataforma robótica (27). Esto ha demostrado ser muy exitoso para producir cristales de proteínas de alta calidad con solo pequeñas superficies hidrófilas, por ejemplo, bacteriorrodopsina (28). Las estructuras de las proteínas de membrana también se pueden determinar con alta resolución mediante cristalográfia electrónica (29).

La evolución de β AR-m23 a partir de β AR₃₄₋₄₂₄ mediante una combinación de mutagénesis por barrido de alanina y la selección de mutantes termoestables ha dado como resultado un GPCR que es ideal para la cristalografía. La Tm de β AR-m23 es 21 °C más alta que la de β AR₃₄₋₄₂₄ y, en presencia de un antagonista, el β AR-m23 tiene una estabilidad similar a la de la rodopsina. El aumento de la Tm de β AR-m23 ha dado como resultado una mayor estabilidad en una variedad de detergentes pequeños que inactivan β AR₃₄₋₄₂₄. Además, la estrategia de selección empleada dio como resultado un receptor que se encuentra preferentemente en la conformación unida al antagonista, lo que también mejorará las posibilidades de obtener cristales, ya que la población de conformaciones del receptor será más homogénea que la del β AR₃₄₋₄₂₄ de tipo salvaje. De este modo, hemos conseguido un proceso de estabilización conformacional en un único procedimiento de selección.

No está del todo claro por qué las mutaciones particulares que hemos introducido conducen a la termoestabilización del receptor. Las posiciones equivalentes en la rodopsina sugieren que los residuos de aminoácidos mutados podrían estar apuntando a la bicapa lipídica, al centro del receptor o a las interfaces entre estos dos entornos. Dadas las dificultades para tratar de entender las complejidades de la termoestabilización de las proteínas solubles [15], parece poco probable que las proteínas de membrana sean más fáciles de comprender; descubrimos que no había ningún patrón particular en los residuos de aminoácidos de β AR que, cuando se mutaban, condujera a la termoestabilidad. Sin embargo, dado que casi el 5 % de los mutantes producidos eran más estables que el receptor nativo, la mutagénesis por barrido de alanina representa una estrategia eficaz para identificar rápidamente los mutantes termoestables.

El procedimiento que hemos utilizado para generar β AR-m23 es igualmente aplicable a cualquier proteína de membrana que tenga un ensayo conveniente para detectar la actividad en la forma solubilizada con detergente. Si bien hemos seleccionado la estabilidad en función de la temperatura como el parámetro principal más conveniente, el procedimiento puede ampliarse fácilmente para ensayar principalmente la estabilidad, por ejemplo, en un detergente fuerte, a un pH extremo o en presencia de sales caotrópicas. La estabilización conformacional de una variedad de receptores, canales y transportadores humanos los hará mucho más aptos para la cristalografía y también permitirá mejorar la resolución de las proteínas de membrana que ya se han cristalizado. Es de esperar que la estabilización

conformacional permitirá que la cristalización de las proteínas de membrana se convierta en un problema mucho más manejable con una mayor probabilidad de éxito rápido que en la actualidad. Esto debería permitir la cristalización rutinaria de las proteínas de la membrana humana en la industria farmacéutica, lo que se traduciría en valiosos conocimientos estructurales sobre el desarrollo de fármacos.

5 MÉTODOS

Materiales. El receptor β 1 adrenérgico truncado de pavo (β AR₃₄₋₄₂₄) [9] fue proporcionado amablemente por el Dr. Tony Warne (Laboratorio de Biología Molecular del MRC, Cambridge, Reino Unido). Esta construcción de β AR que codifica los residuos 34-424 contiene la mutación C116L para mejorar la expresión [11] y una etiqueta C-terminal de 10 histidinas para la purificación. Amersham Bioscience suministró 1-[4,6-propil-³H]-dihidroalprenolol ([³H]-DHA), la sal de bitartrato de (+) L-norepinefrina, el hidrocloruro de (-) isoprenalina, la sal de tartrato de (-) alprenolol y el hidrocloruro de s-propranolol procedían de Sigma.

Mutagénesis de β AR. El ADNc de β AR se ligó en pRGIII para permitir la expresión funcional de β AR en *E. coli* como proteína de fusión MalE [16]. Los mutantes se generaron mediante PCR usando el plásmido de expresión como molde usando la metodología QuikChange II (Stratagene). Las reacciones de PCR se transformaron en células ultracompetentes XL10-Gold (Stratagene) y los clones individuales se secuenciaron completamente para comprobar que solo estaba presente la mutación deseada. Las diferentes mutaciones se combinaron aleatoriamente mediante PCR mediante la inclusión de todos los pares de cebadores que introdujeron las siguientes mutaciones: Mut4, G67A, G068A, V230A, D322A y F327A; Mut6, R068S, Y227A, A234L, A282L y A334L; Mut7, M90V, I129V, Y227A, A282L y F338M; Mut10, R68S, M90V, V230A, F327A y A334L. Las mezclas de PCR se transformaron y los clones se secuenciaron para determinar exactamente qué mutaciones se introdujeron.

Expresión de proteínas y preparaciones de membrana. La expresión de β AR y los mutantes se realizó en células XL10 (Stratagene). Los cultivos de 50 ml de medio 2xTY que contenía ampicilina (100 μ g/ml) se cultivaron a 37 °C con agitación hasta una DO₆₀₀= 3 y luego se indujeron con IPTG 0,4 mM. Los cultivos inducidos se incubaron a 25 °C durante 4 h y luego las células se recogieron mediante centrifugación a 13.000 xg durante 1 min (alícuotas de 2 ml) y se almacenaron a -20 °C. Para los ensayos, las células se rompieron mediante congelación-descongelación (cinco ciclos) y se resuspendieron en 500 μ l de tampón [Tris 20 mM, pH 8, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM e inhibidores de proteasas (Complete™, Roche)]. Tras una incubación durante 1 h a 4 °C con 100 μ g/ml de lisozima y ADNasa I (Sigma), las muestras se solubilizaron con DDM al 2 % en hielo durante 30 minutos. El material insoluble se retiró por centrifugación (15.000 x g, 2 min, 4 °C) y el sobrenadante se usó directamente en los ensayos de unión de radioligandos.

Para preparaciones de membranas a gran escala, se cultivaron 2 L y 6 L de cultivo de *E. coli* de β AR y Mut23, respectivamente, como se describió anteriormente. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 5.000 xg durante 20 min, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Los sedimentos se resuspendieron en 10 ml de Tris 20 mM, pH 7,5, que contenía 1x cóctel de inhibidores de proteasas (Complete™ libre de EDTA, Roche); se añadió 1 mg de ADNasa I (Sigma) y el volumen final se llevó a 100 ml. Las células se rompieron mediante una prensa francesa (2 pasos, 20.000 psi) y se centrifugaron a 12.000 xg durante 45 minutos a 4 °C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante (membranas) se centrifugó a 200.000 x g durante 30 min a 4 °C; el sedimento de las membranas se resuspendió en 15 ml de Tris 20 mM, pH 7,5, y se almacenó en alícuotas de 1 ml a -80 °C tras la congelación instantánea en nitrógeno líquido. La concentración de proteína se determinó mediante el método del negro amido [17]. Estas muestras se usaron en ensayos de unión de radioligandos después de descongelarse y solubilizarse en DDM al 2 % como anteriormente.

Para los ensayos de competición, así como para ensayar diferentes detergentes, el β AR solubilizado en DDM se purificó parcialmente con agarosa Ni-NTA (Qiagen). Se añadieron 200 μ l de agarosa Ni-NTA a 2 ml de muestras solubilizadas (10 mg/ml de proteína de membrana) en Tris 20 mM a pH 8, NaCl 0,4 M, imidazol 20 mM pH 8 y se incubaron durante 1 h a 4 °C. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron a 13.000 x g durante 30 seg y se lavaron dos veces con 250 μ l de tampón (Tris 20 mM, pH 8, NaCl 0,4 M, imidazol 20 mM) que contenía detergente (bien DDM al 0,1 %, DM al 0,1 %, LDAO al 0,3 %, NG al 0,7 % u OG al 0,7 %).

Los receptores se eluyeron en 2 x 100 μ l de tampón (NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM, imidazol 250 mM pH 8, más el detergente relevante). La K_D para la unión del [³H]-DHA a β AR₃₄₋₄₂₄ y β AR-m23 semipurificados fue, respectivamente, de 3,7 nM y 12,5 nM, y la concentración final de [³H]-DHA utilizada en los ensayos de competición fue 3 veces mayor que la K_D, es decir, 12 nM para β AR₃₄₋₄₂₄ y 40 nM para β AR-m23.

Ensayos de unión de radioligandos y termoestabilidad. Los ensayos de unión puntual contenían Tris 20 mM pH 8, NaCl 0,4 M, EDTA 1 mM, DDM al 0,1 % (o el detergente correspondiente) con [³H]-DHA 50 nM y 20-100 μ g de proteína de membrana en un volumen final de 120 μ l; el equilibrio se realizó durante 1 h a 4 °C. La termoestabilidad se evaluó incubando la mezcla de ensayo de unión, con o sin [³H]-DHA a la temperatura especificada durante 30 minutos; las reacciones se colocaron en hielo y se añadió [³H]-DHA según fuera necesario y se equilibraron durante una hora más. Los radioligandos libres y unidos al receptor se separaron mediante filtración en gel como se describió anteriormente [18]. La unión no específica se determinó en presencia de 1 μ M de s-propranolol. Las curvas de saturación se obtuvieron usando un intervalo de concentración de [³H]-DHA de 0,4 nM a 100 nM. Los ensayos de competición se realizaron utilizando una concentración de [³H]-DHA de 12 nM para β AR₃₄₋₄₂₄ y 40 nM para β AR-m23.

(es decir, tres veces la K_D) y varias concentraciones de ligandos no marcados (0-100 mM). La radiactividad se contó en un contador de centelleo líquido Beckman LS6000 y los datos se analizaron mediante regresión no lineal utilizando el software Prism (GraphPad).

Ubicación de las mutaciones termoestables de β AR-m23 en la estructura de la rodopsina. El archivo pdb para la estructura de la rodopsina, código de acceso 1GZM [14], se descargó del sitio web de Protein Data Bank (www.pdb.org) y se mostró en el programa PyMOLX11Hybrid (DeLano Scientific). Los residuos de aminoácidos equivalentes en la rodopsina para las mutaciones termoestables en β AR se localizaron en la estructura de la rodopsina basándose en una alineación entre los cuatro GPCR con los que estamos más familiarizados, a saber, la rodopsina, el receptor $\beta 1$ adrenérgico, el receptor de neuropeptida Y y el receptor de adenosina A_{2a} [19].

10 Ejemplo 2: Mutantes del receptor de adenosina A_{2a} (A_{2a}R) con mayor termoestabilidad

1. 315 mutantes dirigidos a sitio preparados entre los residuos 2-316 de A_{2a}R.
2. Se ha ensayado la termoestabilidad de todos estos mutantes usando un ensayo que mide la unión del agonista y el antagonista después de la etapa de calentamiento (formato de ligando(-) como se describe en la Figura 12).
 - a. 26 mutantes mostraron una termoestabilidad mejorada cuando se midieron con ³H-NECA (agonista): G114A, G118A, L167A, A184L, R199A, A203L, L208A, Q210A, S213A, E219A, R220A, S223A, T224A, Q226A, K227A, H230A, L241A, P260A, S263A, L267A, L272A, T279A, N284A, Q311A, P313A, K315A.
 - b. 18 mutantes mostraron una termoestabilidad mejorada cuando se ensayaron con ³H-ZM241385 (antagonista): A54L, V57A, H75A, T88A, G114A, G118A, T119A, K122A, G123A, P149A, E151A, G152A, A203L, A204L, A231L, L235A, V239A.
3. Las mutaciones se han combinado para generar mutantes en una supuesta conformación antagonista. El A_{2a}R de tipo silvestre tiene una Tm de 31 °C con ZM241385 unido.
 - a. Rant17 A54L+K122A+L235A Tm 48 °C (unido a ZM241385)
 - b. Rant19 A54L,T88A,V239A+A204L Tm 47 °C (unido a ZM241385)
 - c. Rant21 A54L,T88A,V239A+K122A Tm 49 °C (unido a ZM241385)
4. Las mutaciones del cribado agonista se han combinado, pero solo han dado lugar a un nivel muy bajo de mejora de la Tm de +2 °C.

Tabla (i). Lista de mutaciones estabilizadoras de A_{2a}R. Los mutantes se expresaron en *E. coli*, se solubilizaron en DDM al 2 % + glicerol al 10 % y se ensayaron para determinar la unión al ligando, utilizando el agonista [³H]-NECA (derecha) y el antagonista [³H]-ZM241385 (izquierda). Las concentraciones de radioligandos estaban entre 6-10 veces por encima de su K_D medida para el receptor de tipo salvaje. La expresión del receptor activo se evaluó mediante la unión del ligando a 4 °C. La estabilidad se ensayó calentando el receptor solubilizado en su estado apó a 30 °C durante 30 minutos y luego midiendo la actividad de unión residual. En estas condiciones, la actividad de tipo salvaje decrece hasta el 50 % (S.D. = 15 %). Los datos obtenidos para la expresión y la estabilidad se normalizaron con respecto a los valores de tipo salvaje. Las mutaciones incluidas en las rondas posteriores de mutagénesis fueron aquellas cuya expresión fue ≥ 30-40 % y estabilidad ≥ 130-140 % en comparación con el tipo salvaje. Las líneas en negrita indican un grupo de mutaciones.

Agonista			Antagonista		
Mutación	Expresión (%)	Estabilidad (%)	Mutación	Expresión (%)	Estabilidad (%)
wt	100	100	wt	100	100
S090A	151	151	A054L	90	140
G114A	62	143	V057A	44	144
G118A	71	151	H076A	82	152
L167A	41	174	T088A	67	230
A184L	140	150	G114A	73	153
R199A	73	202	G118A	84	148
A203L	42	172	T119A	90	148
L208A	276	215	K122A	52	153
Q210A	46	155	G123A	90	158
S213A	40	140	P149A	54	215
E219A	96	221	E151A	63	173
R220A	84	250	G152A	70	156
S223A	57	146	A203L	111	132
T224A	142	276	A204L	40	181
Q226A	119	217	A231L	90	148
K227A	87	222	L235A	85	140
H230A	57	154	V239A	91	134
L241A	139	156			
P260A	70	169			
S263A	60	158			
L267A	40	187			
L272A	34	157			
T279A	125	158			
N284A	64	151			
Q311A	49	164			
P313A	44	148			
K315A	64	186			

Tabla (ii). Estabilidad de las mejores combinaciones. Los receptores se solubilizaron en DDM al 1 % (sin glicerol). Se obtuvo un perfil de fusión calentando el receptor solubilizado a diferentes temperaturas en ausencia (estado apo) o presencia de ligando (estado ocupado por el ligando). Los datos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. La S.D. es < 1 °C.

	Tm (°C)			Tm (°C)		
	-		+	-		+
	agonista	agonista		agonista	agonista	
Wt	21	29	wt		31	32
Rag 1 (A184L/R199A/L272A)	26	34	Rant 5 (A54L/T88A/V239A)		42	46
Rag 23 (Rag 1+F79A /L208A)	22	38	Rant 21 (Rant 5+K122A)		41	49

Tabla (iii). Resumen de los resultados de los ensayos de competición del A2aR de tipo salvaje solubilizado con detergente y del mutante termoestable Rant 21. Los valores son representativos de dos experimentos independientes. Cada punto de datos se ensayó por triplicado y se representó gráficamente como media ± SD. Cada receptor solubilizado se incubó con ligandos durante una hora en hielo en un tampón de unión (Tris 50 mM, pH 7,5 y DDM al 0,025 %) que contenía NaCl 400 mM. La unión de [³H]ZM241385 (10 nM) en ausencia de ligando no marcado

10

5 se estableció en el 100 %. Los datos mostrados provienen de dos experimentos independientes con cada punto de datos medido por triplicado. La incubación de las muestras con ligandos se realizó durante 1 hora en hielo con [³H]ZM241385 a una concentración de 10 nM. Los valores de K_i se calcularon según la ecuación de Cheng y Prusoff utilizando la ecuación de regresión no lineal del software Prism, aplicando una K_D para [³H]ZM241385 de 12 nM para el tipo salvaje y 15 nM para Rant 21. Rant 21 no se unió a NECA lo suficiente como para una determinación precisa de K_i (por lo tanto, se indica como >1 x 10⁻¹). La afinidad de Rant21 por la unión agonista se debilita 232 veces para R-PIA y al menos 1.900 veces para NECA.

Competidor	K _i (M)	
	wt	Rant 21
XAC	2,3 x 10 ⁻⁶	2,3 x 10 ⁻⁶
Teofilina	1,5 x 10 ⁻³	0,9 x 10 ⁻³
NECA	7,0 x 10 ⁻⁶	>1 x 10 ⁻¹
R-PIA	1,6 x 10 ⁻⁵	3,6 x 10 ⁻³

10 **Tabla (iv). Resumen de los resultados de los ensayos de saturación del A2aR de tipo salvaje solubilizado con detergente y de los mutantes termoestables.** Los valores son representativos de tres experimentos independientes. Cada punto de datos se ensayó por triplicado y se representó gráficamente como media ± SD. Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten utilizando la ecuación de regresión no lineal del software Prism.

Receptor	K _D (nM)	
	[³ H]NECA (agonista)	[³ H]ZM241385 (antagonista)
wt	32 ± 1	12±3
Rag 1	26 ± 0,4	26 ± 0,5
Rag 23	21 ± 1	62 ± 1
Rant 21	>450	15±3

15 **Tabla (v). Resumen de la estabilidad de los receptores de tipo salvaje y mutantes en diferentes detergentes.** La solubilización de los receptores y el intercambio de detergente se realizaron durante la etapa de IMAC. La S.D. es < 1 °C. No fue posible determinar la Tm para algunas combinaciones de receptor-detergente porque el receptor era demasiado inestable (†).

	Tm (°C)			
	Unión a agonistas		Unión a antagonistas	
	wt	Rag 23	wt	Rant 21
DDM al 0,01 %	27	34	25	39
DM al 0,1 %	23	29	10	28
NM al 0,3 %	22	28	< 4	25
NG al 0,3 %	†	†	†	22
OG al 0,6 %	<9	16	†	23
LDAO al 0,003 %	28	38	32	42
FC12 al 0,006 %	37	39	43	49

Ejemplo 3: Mutantes del receptor de neurotensina (NTR) con mayor termoestabilidad

- 20 1. Se han producido 340 mutantes dirigidos a sitio entre los residuos 61-400 de NTR.
2. Inicialmente, se ensayó la termoestabilidad de todos estos mutantes usando un ensayo que medida la unión de la ³H-neurotensina (agonista) después de la etapa de calentamiento. 24 mutaciones condujeron a un aumento pequeño, pero significativo, de la termoestabilidad: A356L, H103A, D345A, A86L, A385L, Y349A, C386A, K397A, H393A, I116A, F358A, S108A, M181A, R392A, D113A, G209A, L205A, L72A, A120L, P399A, Y351A, V268A, T207A, A155L, S362A, F189A, N262A, L109A, W391A, T179A, S182A, M293A, L256A, F147A, D139A, S100A,
- 25

K176A, L111A, A90L, N270A.

3. Los mutantes ensayados para determinar la termoestabilidad mediante calentamiento en ausencia del agonista se volvieron a ensayar usando un ensayo ligeramente diferente en el que los mutantes se calentaron en presencia de ^3H -neurotensina (formato de ligando (+) en la Figura 12). Los mutantes con termoestabilidad mejorada son: A69L, A73L, A86L, A90L, H103A, V165A, E166A, G215A, V229A, M250A, I253A, A177L, R183A, I260A, T279A, T294A, G306A, L308A, V309A, L310A, V313A, F342A, F358A, V360A, S362A, N370A, S373A, F380A, A385L, P389A, G390A, R395A.
4. También hay mutantes que tienen un nivel de expresión significativamente mejorado en comparación con el receptor de tipo salvaje y podrían usarse para aumentar los niveles de producción de receptores para la cristalización: A86L, H103A, F358A, S362A, N370A, A385L, G390A. Todos estos también tienen una mayor termoestabilidad.
5. Las combinaciones preferidas son
- a. Nag7m F358A+A86L+I260A+F342A Tm 51 °C (unido a neurotensina)
- b. Nag7n F358A+H103A+I260A+F342A Tm 51 °C (unido a neurotensina)

10 15 El NTR de tipo salvaje tiene una Tm de 35 °C con neurotensina unida.

Ejemplo 4: Identificación de restos estructurales en los que residen las mutaciones estabilizadoras del GPCR.

Se ha determinado la estructura del receptor $\beta 2$ adrenérgico (20, 21), que es idéntico en un 59 % al receptor $\beta 1$ de pavo, pero con un perfil farmacológico claramente diferente (22, 23). Con el fin de determinar los restos estructurales en los que residen las mutaciones estabilizadoras del receptor $\beta 1$ de pavo, mapeamos las mutaciones en la estructura de $\beta 2$ humano (21).

20 25 Los receptores beta adrenérgicos se alinearon en primer lugar utilizando ClustalW en el paquete MacVector; se destacaron las mutaciones termoestabilizadoras en el $\beta 1$ de pavo junto con el residuo correspondiente en la secuencia de $\beta 2$ humano. El modelo de $\beta 2$ humano (código de acceso pdb 2RH1) se visualizó en Pymol y los aminoácidos deseados se mostraron como modelos de llenado de espacios mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica. Los restos estructurales en los que se localizaron las mutaciones estabilizadoras se determinaron mediante inspección visual.

La Tabla (vi) enumera las posiciones equivalentes en el receptor $\beta 2$ correspondientes a las mutaciones termoestabilizadoras en $\beta\text{AR-m23}$ y los restos estructurales en los que residen.

30 35 Como se ve en la Tabla (vi), las mutaciones se posicionan en varias localizaciones distintas. Hay tres mutaciones en regiones de bucle que se prevé que sean accesibles al disolvente acuoso (bucle), hay ocho mutaciones en las hélices α transmembrana y apuntan a la bicapa lipídica (lípido); tres de estas mutaciones se encuentran cerca del final de las hélices y se puede considerar que se encuentran en la capa límite hidrófila (límite lipídico). Se encuentran ocho mutaciones en las interfaces entre las hélices α transmembrana (interfaz hélice-hélice), tres de las cuales se encuentran dentro de una región retorcida o distorsionada de la hélice (torsión) y otras dos mutaciones ocurren en una hélice, pero están adyacentes a una o más de otras hélices que contienen una torsión adyacente en el espacio al residuo mutado (torsión opuesta). Estas últimas mutaciones podrían afectar al empaquetamiento de los aminoácidos dentro de la región retorcida, lo que podría resultar en una termoestabilización. Otra mutación se encuentra en un bolsillo de unión al sustrato (bolsillo).

	$\beta 1$ de pavo	$\beta 2$ humano	Descripción	
Hélice 1	I55A	I47	interfaz de torsión de 3 hélices	Fig. 18
Hélice 1	G67A	A59	límite lipídico	
Hélice 1	R68S	K60	límite lipídico	Fig. 25
Hélice 2	V89L	V81	torsión	Fig. 19
Hélice 2	M90V	M82	torsión	Fig. 20
Hélice 2	G98A	G90	bolsillo	
Hélice 3	I129V S151E	I121 S143	torsión opuesta bucle	Fig. 21
Hélice 4	V160A Q194A	V152 A186	lípido bucle	

Hélice 5	L221V	V213	lípido	
Hélice 5	Y227A	Y219	interfaz hélice-hélice	Fig. 23
Hélice 5	R229Q	R221	lípido	
Hélice 5	V230A	V222	interfaz hélice-hélice	
Hélice 5	A234L	A226	interfaz hélice-hélice	
Hélice 6	A282L	C265	bucle	Fig. 24
	D322A	K305	límite lipídico	
Hélice 7	F327A	L310	lípido	
Hélice 7	A334L	V317	lípido	
Hélice 7	F338M	F321	torsión	Fig. 22

Tabla (vi) Posición en la estructura de $\beta 2$ humano de los residuos de aminoácidos equivalentes a las mutaciones termoestabilizadoras encontradas en el receptor $\beta 1$ de pavo y los restos estructurales en los que residen.

5 Dichos restos estructurales, en virtud de que contienen mutaciones estabilizadoras, son importantes para determinar la estabilidad de las proteínas. Por lo tanto, dirigir las mutaciones a estos restos facilitará la generación de GPCR mutantes estabilizados. De hecho, hubo varios casos en los que más de una mutación se mapeó en el mismo resto estructural. Por ejemplo, las mutaciones Y227A, V230A y A234L en el receptor adrenérgico $\beta 1$ de pavo se mapearon todas en la misma interfaz helicoidal, las mutaciones V89L y M90V se mapearon en la misma torsión helicoidal y las mutaciones F327A y A334L se mapearon en la misma superficie helicoidal que apunta hacia la bicapa lipídica (Tabla 10 (vi)). Por tanto, cuando se ha identificado una mutación estabilizadora, la determinación del resto estructural en el que se encuentra esa mutación permitirá la identificación de otras mutaciones estabilizadoras.

Ejemplo 5: Generación de parejas de unión específicas de conformación de los GPCR

15 La generación de GPCR mutantes que tienen una mayor estabilidad en una conformación particular en relación con un GPCR parental proporciona una serie de ventajas para el cribado de las parejas de unión. Por ejemplo, los presentes métodos reducen la cantidad de material requerida para un cribado. En los cribados estándar, los GPCR están presentes en células completas o en membranas de células completas que normalmente se criban mediante incubación con compuestos individuales en cámaras aisladas en lugar de bibliotecas de compuestos. Por lo tanto, la presente invención proporciona ventajas en términos del tiempo requerido para llevar a cabo un cribado de compuestos. La capacidad de bloquear un GPCR en una conformación particular proporciona ventajas porque aumenta la probabilidad de identificar un ligando con las propiedades farmacológicas requeridas. En los cribados de unión estándar, los GPCR pueden asumir una serie de conformaciones diferentes y los compuestos de unión se identificarán a lo largo de diferentes tipos farmacológicos. Los costes de los reactivos se pueden reducir debido a la capacidad de miniaturizar los formatos de ensayo y esto se ve facilitado por el presente método.

MÉTODOS

25 Cribado de compuestos

Un GPCR mutante que tiene una estabilidad aumentada en una conformación particular se inmoviliza sobre una superficie sólida y se incuba con un tampón que contiene una biblioteca codificada de compuestos. Tras un período de tiempo adecuado, para permitir la unión entre el GPCR mutante y los compuestos de la biblioteca que se unen selectivamente al GPCR mutante, se retira el tampón. A continuación, siguen una serie de etapas de lavado para eliminar los compuestos que no se han unido específicamente al GPCR mutante. El código, la etiqueta o la dirección de lectura (como el ADN o el ARN) se utilizan entonces para identificar la molécula pequeña unida mientras aún está unida al GPCR mutante o después de la elución del GPCR. La pareja de unión específica de conformación se aísla posteriormente.

Selección de anticuerpos usando GPCR inmovilizados

35 Los GPCR estabilizados inmovilizados se pueden usar para seleccionar anticuerpos contra el receptor a partir de mezclas de anticuerpos tales como las que estarían presentes en el plasma de un animal inmunizado con el GPCR estabilizado, el receptor nativo o un péptido del receptor. Los anticuerpos podrían identificarse a partir de sobrenadantes obtenidos de células B tomadas de animales inmunizados o de hibridomas obtenidos tras la inmortalización de células B del animal inmunizado o de bibliotecas de anticuerpos recombinantes que pueden expresarse en partículas de fagos o mediante un sistema de expresión in vitro, tal como la presentación en ribosomas.

40 El método tiene la ventaja de seleccionar anticuerpos contra conformaciones particulares de un receptor. Un GPCR estabilizado bloqueado en el estado antagonista o de fondo del receptor aumentaría la probabilidad de seleccionar un anticuerpo antagonista, mientras que un GPCR estabilizado bloqueado en el estado activado o R* aumentaría la probabilidad de seleccionar un anticuerpo activador. En los cribados estándar, los anticuerpos se seleccionan con

frecuencia contra los GPCR que se unen a los epítopos peptídicos del receptor, pero que no tienen propiedades antagonistas o agonistas y, por lo tanto, no son útiles como agentes terapéuticos.

Ejemplo 6: Selección de fagos de anticuerpos en el receptor β-adrenérgico

Resumen

- 5 Hemos utilizado el receptor β-adrenérgico estabilizado (β-AR) para generar anticuerpos usando la presentación en fagos. Los clones de fagos positivos mostraron especificidad para β-AR y la subclonación de genes de anticuerpos seleccionados condujo a la producción exitosa de anticuerpos scFv anti-β-AR específicos.

Introducción

- 10 La aplicación terapéutica de los anticuerpos en el área de los sistemas receptor-ligando tiene un gran potencial. Sin embargo, el problema principal a la hora de generar anticuerpos (mediante métodos *in vitro* o *in vivo*) contra los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) se refiere al reconocimiento inmunogénico de una conformación específica en una preparación de antígenos homogénea, es decir, una conformación agonista o una conformación antagonista, en lugar de crear un conjunto de ligantes de anticuerpos que reconozca el antígeno purificado en múltiples conformaciones en una preparación heterogénea. Además, el antígeno receptor recombinante normalmente solo está disponible en la forma de dominio extracelular, lo que excluye cualquier estructura terciaria que implique otras partes del receptor. La solución propuesta para este problema es la aplicación de GPCR estabilizados como antígeno diana.
- 15

- 20 Hemos demostrado la utilidad de los GPCR estabilizados (StaRs™) en la generación de anticuerpos recombinantes mediante el método *in vitro* de presentación en fagos de manera que puedan aislarse los anticuerpos que se unen al receptor β adrenérgico estabilizado en la conformación antagonista. Dichos anticuerpos pueden luego someterse a ensayos funcionales, por ejemplo, en ensayos de unión a ligandos.

Descripción general del proceso

- 25 Una estrategia de presentación en fagos típica comprende varias etapas en el proceso para identificar los clones de scFv inhibidores (Figura 29). La primera parte es la selección de bibliotecas de fagos en el antígeno para aislar una población de ligantes de anticuerpos de fagos utilizando diversas metodologías (por ejemplo, selección por cribado, selección soluble, etc.). Esta población resultante de ligantes de anticuerpos de fagos se denomina resultado de selección. Este proceso se repite 2-4 veces para enriquecer los ligantes de antígenos específicos.

- 30 Se evalúa un conjunto de clones que representa un resultado de selección (ELISA de fagos policlonales) para determinar el reconocimiento del antígeno mediante ELISA de fagos. Los clones individuales también pueden evaluarse mediante ELISA de fagos monoclonales y para determinar su diversidad mediante análisis de secuencias, sin embargo, el método preferido es subclonar la población seleccionada en un vector de expresión de anticuerpos recombinantes (pSANG 10-3F) y, a continuación, realizar la evaluación mediante ELISA de scFv monoclonal y secuenciación de ADN. Esto evita el problema de identificar los ligantes de anticuerpos de fagos que posteriormente muestran una mala expresión como fragmentos scFv. Los resultados de selección que producen diversos positivos de ELISA pueden entonces priorizarse para el cribado funcional de paneles más grandes de anticuerpos de fagos.

- 35 Los resultados de selección se someten a una campaña de cribado, que emplea un ensayo funcional de alto rendimiento, de extractos periplásmicos con el fin de identificar una población de inhibidores scFv. Por último, los resultados de la campaña de cribado se perfilan como scFv mediante ensayos funcionales adicionales, así como mediante análisis de Cl50 que evalúan la eficiencia de su acción inhibidora.

Métodos y resultados

- 40 Se llevaron a cabo 2-3 rondas de selección de anticuerpos utilizando β-AR estabilizado como antígeno y utilizando la biblioteca de presentación en fagos de anticuerpos "McCafferty" descrita en Schofield *et al*, 2007 (24). Las selecciones se llevaron a cabo en PBS en presencia (A) o ausencia (B) de ligando (-) -alprenolol 20 nM durante las etapas de unión y lavado. Además, para la manipulación de la proteína β-AR, todos los tampones de recubrimiento, lavado y bloqueo se suplementaron con un detergente decilmaltósido al 0,1 % (Anatrace, Anagrade). El éxito relativo de los seleccionados se determinó usando ELISA de fagos policlonales y ELISA de fagos monoclonales.
- 45

Optimización para inmovilizar el antígeno

- 50 Las estrategias de inmovilización se basaron en aprovechar el antígeno etiquetado con His. En primer lugar, la inmovilización se realizó utilizando proteínas de control en lugar de βAR-m23. Se empleó una variedad de superficies, incluidas placas de Ni-NTA, en la evaluación inicial. Todas se compararon con la absorción pasiva estándar en placas Nunc. En todos los casos, el resultado se evaluó usando ELISA de fagos policlonales después de 2 rondas de selección.

Selección de anticuerpos

La selección, elución y rescate de la biblioteca fue como se describe en Schofield *et al* (2007). Se recubrieron 150 µl de β-AR a una concentración de 20 µg/ml durante una noche a +4 °C en dos (24) pocillos de una placa de quelato de

níquel (Nunc). El receptor se diluyó en un tampón de recubrimiento que es Tris 20 mM pH8, NaCl 100 mM, decilmaltósido al 0,1 % (dec-M) y también un ligando 20 nM para la selección A. Al día siguiente, los pocillos se enjuagaron con PBS y se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con proteína de leche Marvel al 3 % en PBS suplementado con dec-M al 0,1 % (PBS-M). Tras el recubrimiento, el pocillo se enjuagó con PBS y se añadieron 100 µl de una biblioteca de fagos previamente bloqueada en Marvel/PBS al 2 % y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la unión, las muestras se lavaron 6 veces en PBS/Tween al 0,1 % suplementado con dec-M al 0,1 % y seis veces en PBS suplementado con dec-M al 0,1 %. El fago unido se eluyó luego con tripsina (24). Los fagos eluidos se añadieron a las células TG1 en crecimiento exponencial (a una $DO_{600} = 0,5$) y se cultivaron a 37 °C durante 1 h. Las células infectadas se sembraron en placas TY suplementadas con 100 µg/ml de ampicilina y glucosa al 2 % y se cultivaron durante la noche a 30 °C. Al día siguiente, las placas se rasparon en medio TY suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y glicerol al 15 % para su almacenamiento. La población de esta primera ronda de selección se rescató con fagos auxiliares y se precipitó con PEG y 100 µl de estos se usaron en una segunda ronda de selecciones usando las mismas condiciones y procedimientos que los descritos para la ronda 1.

ELISA de fagos policlonales

Para el ELISA, el βAR se inmovilizó covalentemente en placas Amino (número de catálogo Nunc: 436008). Los tampones de recubrimiento y lavado se suplementaron con ligando 20 nM y dec-M al 0,1 %. La placa de ELISA se recubrió durante la noche con β-AR a 24 µg/ml y 2 proteínas de control (CD86 y Notch1) a 5 µg/ml. Al día siguiente, los pocillos se lavaron y se bloquearon con PBS-M. Se añadieron 50 µl/pocillo de fago polyclonal de 2 rondas de selección (en PBS-M, a una concentración de 0,1x con respecto al volumen de cultivo inicial) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron y se incubaron con un anticuerpo α-M13 (no. de producto de GE healthcare: 27-9421-01), durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se incubaron con un anticuerpo anti-ratón marcado con europio (Perkin Elmer, No. de producto: AD 0207), durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron y se añadieron 50 µl/pocillo de solución de mejora (Perkin Elmer, No. de producto: 4001-0010) y se incubó durante 10 min. Los resultados se muestran en la Figura 30A, que sugiere un enriquecimiento específico del fago que se une al β-AR en los experimentos A y B después de 2 rondas de selección. Las señales fueron más altas en la selección de fagos A (con el ligando presente en los tampones).

ELISA de fagos monoclonales

Para este ensayo, se recogieron clones individuales de fagos de la ronda 2 de la selección A, se rescataron y se precipitaron con PEG. De nuevo, los tampones de recubrimiento, lavado, bloqueo y detección de anticuerpos se suplementaron con ligando 20 nM y detergente al 0,1 %. Los pocillos de una placa Amino de Nunc se recubrieron con β-AR durante 1 h 30 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos recubiertos se lavaron 3 veces con PBST y 3 veces con PBS y se bloquearon con PBS-M y se añadieron 50 µl/pocillo de 0,1x fago y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 6 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo α-M13 durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar 6 veces con PBS, los pocillos se incubaron con el anticuerpo anti-ratón-Eu, durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se lavaron y se incubaron con una solución de mejora durante 10 min. De los 69 clones cribados, 20 clones se detectaron como positivos (Figura 30B).

ELISA de fagos de especificidad

Se analizaron 17 de los clones de fagos positivos del ELISA monoclonal para determinar la especificidad de unión al β-AR y 3 proteínas no relacionadas. Estas incluyen N1-EGF (los dominios EGF 1-12 del Notch1 murino fusionados con un dominio Fc humano de R&D Systems, número de catálogo 1057-TK). Las otras proteínas de control incluyen el dominio extracelular del CD86 murino y la región reguladora negativa del Notch1 murino expresado como una fusión de CD4 (CD86 y N1(NRR, respectivamente) en un sistema de expresión transitorio como se describe en Chapple et al 2006 (25). En este ELISA, se usaron tanto el quelato de níquel como la placa amino para la comparación. Una vez más, para los pocillos que contienen la proteína β-AR, los tampones de recubrimiento, lavado, bloqueo y unión a anticuerpos se suplementaron con ligando 20 nM y detergente al 0,1 %. Los pocillos se lavaron y se incubaron con anticuerpos como se describió para el ELISA monoclonal en la sección anterior. El ensayo mostró que se pueden utilizar placas His y Amino y que la mayoría de los clones anti-β-AR no reaccionan de forma cruzada con las proteínas no relacionadas (Figura 31).

Expresión y cribado de scFv monoclonal

La subclonación, la expresión y purificación del Fv monocatenario del anticuerpo (scFv) fueron como se describe en Schofield et al (2007). Los genes de anticuerpos seleccionados dentro de la población de fagos de la ronda 2 (selección A) se subclonaron en el vector pSANG10-3F (26) y se transformaron en células BL21 (DE3). Se seleccionaron 96 colonias y se indujo la expresión periplásica del anticuerpo scFv en un formato de 96 pocillos usando métodos estándar en la técnica. Los scFv se recuperaron del periplasma y se usaron para ELISA en una placa Amino (Nunc). Los pocillos lavados y bloqueados se incubaron durante 1 h con 50 µl/pocillo de scFv. Las placas se lavaron y se incubaron con un anticuerpo anti-FLAG marcado con europio durante 1 h a temperatura ambiente. 12 clones dieron una señal por encima de 1.000 unidades con niveles de fondo inferiores a 50 para los clones negativos (Figura 32).

Los clones positivos se seleccionan con unión y se confirmaron específicamente en un ELISA secundario, y los clones

de interés se secuencian. Las secuencias de anticuerpos se analizan para identificar el número de clones de unión únicos que se han aislado.

- 5 Para ensayar el bloqueo de la unión del ligando por parte de anticuerpos aislados, se seleccionan clones de anticuerpos positivos únicos para su preparación a mayor escala (50-500 ml) usando extracción periplásmica y cromatografía de afinidad por metales inmovilizados. Se evalúa la capacidad de este material para interferir en la unión del ligando al receptor utilizando ensayos informadores robustos (por ejemplo, la inhibición de la generación de AMPc o la inhibición de la unión del ligando a las células transfectedas).

Ejemplo 7: Evaluación de la interacción de los compuestos con $\beta 1$ -AR

Métodos y resultados:

- 10 Los estudios de unión se realizaron a 10 °C utilizando un biosensor óptico Biacore S51 equipado con un chip CM5 recubierto con estreptavidina y se equilibraron con un tampón de funcionamiento (TrisHCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DMSO al 1 %, maltósido de decilo al 0,1 %, pH 7,8).

Inmovilización de $\beta 1$ AR.

- 15 El $\beta 1$ AR36-M23 se biotiniló mínimamente usando biotina EZ-Link sulfo-NHS-LC-LC (Pierce #21338): La biotina se añadió a la preparación del receptor (enriquecida con 100 um de alprenolol) y se dejó reaccionar durante tres horas a 4 °C, tras lo cual se retiró la biotina libre mediante cromatografía en columna.

La Figura 33 muestra las dos etapas de captura del $\beta 1$ AR biotinilado en una celda de flujo recubierta de estreptavidina. En la primera etapa, capturamos ~1.200 RU; en la segunda, ~4.000 RU.

- 20 Los chips sensores biacore recubiertos con el receptor beta estabilizado podrían usarse para caracterizar la unión de fármacos con actividad en el receptor beta. El flujo a través del compuesto permitió determinar la tasa de asociación. El lavado posterior permitió la determinación de la tasa de disociación. Estos parámetros podrían usarse entonces para determinar una medición de afinidad cinética (K_d).

- 25 La Figura 34 muestra las respuestas para el alprenolol que se ensayó por duplicado en una serie de diluciones de tres veces para determinar su unión a la superficie del receptor. La concentración más alta es de 666 nM y cada concentración se ensayó tres veces. Las respuestas dependen de la concentración y son reproducibles. Las líneas grises representan el ajuste de un modelo simple de interacción 1:1 y los parámetros determinados a partir de este ajuste se enumeran en el recuadro (el número entre paréntesis es el error en el último dígito).

- 30 La Figura 35 es una representación alternativa del conjunto de datos de la Figura 34. Las respuestas se normalizan con respecto a la Rmáx determinada (a partir del ajuste) para cada curva.

- 35 Los datos del alprenolol demuestran que el $\beta 1$ AR biotinilado es activo y este enfoque de biosensor se puede utilizar para caracterizar las interacciones compuesto/receptor.

La Figura 36 muestra las respuestas de la unión del propranolol a $\beta 1$ AR. 111 nM es la concentración más alta y cada concentración se ensayó dos o tres veces. Los datos del propranolol se representan gráficamente como respuestas normalizadas en la Figura 37.

- 40 Cuando la superficie del $\beta 1$ AR tenía casi tres días, volvimos a ensayar la unión del alprenolol para determinar cuánta actividad había perdido el receptor con el tiempo. La Figura 38 muestra las respuestas de unión del alprenolol con 333 nM como la concentración más alta. El receptor parecía estar casi tan activo como cuando fue capturado por primera vez.

Captura de $\beta 1$ AR en otro lugar.

- 45 El biosensor S51 tiene la capacidad de monitorizar dos puntos de reacción a la vez, por lo que capturamos el receptor a una densidad de 8.000 RU en otro punto recubierto de estreptavidina (Figura 39).

Los datos de una prueba de unión del alprenolol al punto de $\beta 1$ AR de 8.000-RU se proporcionan en la Figura 40.

- 50 El salmeterol, agonista del receptor beta, se ensayó usando una concentración máxima de 1,67 μ M, y cada concentración se ensayó dos o tres veces (Figuras 41A y B). Las respuestas dependen de la concentración y son reproducibles en su mayoría. Además, las respuestas de la superficie de 8.000 RU (Figura 41B) fueron mayores que las de la superficie de 4.200 RU (Figura 41A), como se esperaba.

- 55 El salmeterol se disoció mucho más rápido y se unió al receptor mucho más débilmente de lo que lo hicieron el alprenolol o el propranolol. Esto es de esperar, ya que el salmeterol tiene una baja afinidad por el $\beta 1$ -AR y, en particular, tiene una baja afinidad por la forma estabilizada por el antagonista del receptor que se usa aquí. Además, detectamos cierta complejidad en la interacción, como lo indica el mal ajuste del modelo a las respuestas durante la fase de disociación ($t > 60$ seg). Las Figuras 42A y B muestran los datos representados gráficamente como respuestas

normalizadas.

El isoproterenol, un agonista beta-adrenérgico no selectivo, se ensayó utilizando una concentración máxima de 2 μ M (Figuras 43A y B). En este análisis, el isoproterenol mostró una tasa de asociación mucho más lenta que los otros compuestos. El compuesto se inyectó durante 90 seg.

- 5 Las Figuras 44A y B muestran las respuestas para la unión de carvedilol 111 μ M y 333 nM a las dos superficies de b1AR. El carvedilol muestra una tasa de disociación mucho más lenta que los otros compuestos examinados hasta ahora.

Conclusión

1. La biotinilación mínima y la captura por la estreptavidina produjeron superficies b1AR activas que pueden usarse para medir la unión de compuestos.
- 10 2. A 10 °C, las superficies b1AR permanecieron activas durante varios días.
3. Para los compuestos ensayados incluidos agonistas y antagonistas, observamos diferencias tanto en las tasas de asociación como de disociación, así como en las afinidades. Esto demuestra que el ensayo de biosensor es un enfoque viable para caracterizar paneles de compuestos que se unen a esta preparación de b1AR.
- 15 4. Los parámetros de unión se determinaron para varios compuestos como se muestra en la Tabla A siguiente, todos los cuales se midieron a 10 °C.

Tabla A

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
Alprenolol	$(1,453 \pm 0,007) \times 10^5$	$(6,3 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	44 ± 1
Propranolol	$(5,94 \pm 0,02) \times 10^5$	$(2,17 \pm 0,04) \times 10^{-3}$	$3,64 \pm 0,07$
Salmeterol <small>¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.</small>	$(3,8 \pm 0,3) \times 10^4$	$(9,5 \pm 0,4) \times 10^{-2}$	2.500 ± 300
Isoproterenol <small>¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.</small>	$(6 \pm 2) \times 10^3$	$(4,4 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	800 ± 300
Carvedilol <small>¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.</small>	$(2,3 \pm 0,9) \times 10^5$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	5 ± 3

¹ promediado a partir de dos superficies b1AR

² resultados preliminares

- 20 **Ejemplo 8: Uso de StaR de adenosina A_{2a} para el cribado de compuestos en el descubrimiento de fármacos**

Métodos

- Se usó un receptor de adenosina A_{2a} termoestabilizado (A_{2a} Star) seleccionado conformacionalmente en la forma antagonista (denominado Rant22) para cribar compuestos de una biblioteca con el fin de identificar compuestos con actividad en el receptor A_{2a}. El StaR se generó como se describió anteriormente (Magnani et al., Co-evolving stability and conformational homogeneity of the human adenosine A_{2a} receptor. Proc Natl Acad Sci U S A., 5 de agosto de 2008; 105 (31): 10744-9). Las células HEK293T transfectadas con los receptores A_{2a} Rant22 se cultivaron en una monocapa en matraces T-175 a 37 °C y con CO₂ al 5 % en el medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero bovino fetal al 10 %. Las células se recogieron raspando las células de la superficie del T-175 y se recogieron mediante centrifugación.

- 30 **Preparación de membranas.**

- Los sedimentos celulares se resuspendieron en 10 ml de HEPES 20 mM, pH 7,4 más comprimidos de cóctel de inhibidores de proteasas (Roche) y se homogeneizaron durante 30 s a 20.500 rpm utilizando un homogeneizador de tejido. Los homogeneizados se centrifugaron a 200xg durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se retiró y se reservó en hielo. Este procedimiento se repitió dos veces más y los sobrenadantes agrupados se centrifugaron a 40.000xg durante 45 min a 4 °C. Las membranas se resuspendieron en alícuotas de 1 ml de HEPES 20 mM, pH 7,4 más comprimidos de inhibidores de proteasas. La concentración de proteína se determinó mediante un ensayo de proteína BCA (Pierce).

Ensayo de cribado.

Se incubaron alícuotas de 10 µg de membrana preparada con [³H]ZM241385 3,7 nM y una cantidad apropiada de ligando no marcado durante 60 min a temperatura ambiente. Se cribó una dilución en serie que oscilaba entre 10 mM - 1 µM en un formato de 96 pocillos. Las placas de GFC de filtro se remojaron previamente en PEI al 0,1 % durante 5 60 min. La radiactividad se determinó mediante recuento por centelleo líquido usando un contador Microbeta a 3 min/pocillo.

Resultados

Los datos se analizaron utilizando el GraphPad prism para ajustar las curvas de respuesta a la concentración. La IC₅₀ de los compuestos se calculó como la concentración que resulta en una inhibición del 50 % de la unión específica de [sup>3]H]ZM241385. Los datos presentados en la Figura 45 y en la Tabla B a continuación demuestran que los compuestos ensayados fueron capaces de inhibir la unión al receptor A2a StaR y que tuvieron una variedad de actividades en este ensayo. Estos datos demuestran la utilidad de los StaR para el cribado de compuestos.
10

Tabla B

	HTL0245	HTL0246	HTL0247	HTL0248	HTL0249	HTL0250	HTL0251	HTL0252	CGS15943
Valores que mejor se ajustan									
Parte inferior	105,2	151,2	47,23	44,21	25,74	13,98	-5,831	176,4	22,40
Parte superior	1.428	1.414	1.406	1.519	1.527	1.382	1.446	1.257	1.530
LogC150	-6,795	-6,442	-7,552	-8,098	-8,431	-4,112	-2,874	-4,658	-8,661
C150	1,605e-007	3,614e-007	2,804e-008	7,985e-009	3,709e-009	7,735e-009	0,001337	2,199e-005	2,183e-009
Error Estd.									
Parte inferior	29,07	70,00	40,67	18,05	7,115	104,4	79,15	154,9	29,97
Parte superior	44,68	83,73	96,91	50,84	20,46	38,13	26,10	74,89	40,93
LogC150	0,07888	0,1886	0,1338	0,05205	0,02427	0,1202	0,2821	0,2878	0,08677

REFERENCIAS

1. S. H. White (2004) *Protein Sci* **13**, 1948-1949.
2. C. G. Tate (2001) *FEBS Lett* **504**, 94-98.
3. R. Grisshammer, C. G. Tate (1995) *Q Rev Biophys* **28**, 315-422.
- 5 4. J. U. Bowie (2001) *Curr Opin Struct Biol* **11**, 397-402.
5. F. W. Lau, S. Nauli, Y. Zhou, J. U. Bowie (1999) *J Mol Biol* **290**, 559-564.
6. Y. Zhou, J. U. Bowie (2000) *J Biol Chem* **275**, 6975-6979.
7. S. Faham, D. Yang, E. Bare, S. Yohannan, J. P. Whitelegge, J. U. Bowie (2004) *J Mol Biol* **335**, 297-305.
8. Y. Yarden, H. Rodriguez, S. K. Wong, D. R. Brandt, D. C. May, J. Burnier, R. N. Harkins, E. Y. Chen, J. Ramachandran, A. Ullrich, *et al* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6795-6799.
- 10 9. T. Warne, J. Chirnside, G. F. Schertler (2003) *Biochim Biophys Acta* **1610**, 133-140.
10. E. M. Parker, E. M. Ross (1991) *J Biol Chem* **266**, 9987-9996.
11. E. M. Parker, K. Kameyama, T. Higashijima, E. M. Ross (1991) *J Biol Chem* **266**, 519-527.
12. W. J. Degrip (1982) *Methods in Enzymology* **81**, 256-265.
- 15 13. K. Palczewski, T. Kumakawa, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, *et al* (2000) *Science* **289**, 739-745.
14. J. Li, P. C. Edwards, M. Burghammer, C. Villa, G. F. Schertler (2004) *J Mol Biol* **343**, 1409-1438.
15. R. Jaenicke, G. Bohm (1998) *Current Opinion in Structural Biology* **8**, 738-748.
16. J. Tucker, R. Grisshammer (1996) *Biochem J* **317** (Pt 3), 891-899.
- 20 17. W. Schaffner, C. Weissmann (1973) *Anal. Biochem.* **56**, 502-514.
18. C. G. Tate (1998) *Methods Enzymol* **296**, 443-455.
19. H. M. Weiss, R. Grisshammer (2002) *Eur J Biochem* **269**, 82-92.
20. 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., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I. y Kobilka, B. K. (2007) *Nature* **15**, 383-387.
- 25 21. Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K. y Stevens, R. C. (2007) *Science* **318**:1258-1265.
22. Minneman, K. P., Weiland, G. A. y Molinoff, P. B. (1980) *Mol Pharmacol* **17**:1-7.
23. Parker, E. M., Swigart, P., Nunnally, M. H., Perkins, J. P. y Ross, E. M. (1995) *J Biol Chem* **270**:6482-6487.
- 30 24. Schofield DJ, Pope A, Clementel V, Buckell J, Chapple SDJ, Clarke KF, Conquer JS, Crofts AM, Crowther SRE, Dyson MR, Flack G, Griffin GJ, Hooks Y, Howat WJ, Kolb-Kokocinski A, Kunze S, Martin CD, Maslen GL, Mitchell JM, O'Sullivan M, Perera RL, Roake W, Shadbolt SP, Vincent KJ, Warford A, Wilson WE, Xie J, Young JL, McCafferty J (2007) Application of phage display to high throughput antibody generation and characterisation. *Genome Biology*. **8** (11) R254
- 35 25. Chapple SD, Crofts AM, Shadbolt SP, McCafferty J, Dyson MR. (2006) Multiplexed expression and screening for recombinant protein production in mammalian cells. *BMC Biotechnol.* 2006 dic 22;6:49. <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/6/49>
26. Martin C, Rojas G, Mitchell JN, Vincent KJ, Wu J, McCafferty J, Schofield DJ (2006) A simple vector system to improve performance and utilisation of recombinant antibodies. *BMC Biotechnology* **6**:46 doi: 10.1186/1472-6750-6-46 <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/6/46/abstract>
- 40 27. Warne *et al* (2008) Structure of a β adrenergic G protein coupled receptor *Nature* **454**: 486-491

REIVINDICACIONES

1. Un biosensor que comprende un mutante de un receptor acoplado a proteína G (GPCR) humano de tipo salvaje que tiene una termoestabilidad conformacional aumentada en comparación con el GPCR humano de tipo salvaje; en donde:

- 5 i. el mutante es un receptor β -adrenérgico mutante que, en comparación con el correspondiente receptor β -adrenérgico de tipo salvaje, tiene al menos el reemplazo de un aminoácido en una posición que, cuando se utilizan MacVector y CLUSTALW, se alinea en una cualquiera o más de las siguientes posiciones según la numeración del receptor β -adrenérgico de pavo tal como se establece en la SEQ ID NO: 1: I55, G67, R68, V89, M90, G98, I129, S151, V160, Q194, L221, Y227, R229, V230, A234, A282, D322, F327, A334, F338, y, en donde, después de su reemplazo, la identidad del residuo de aminoácido en la posición alineada según la numeración del receptor β -adrenérgico de pavo tal como se establece en la SEQ ID NO: 1 es la siguiente: 55A, 67A, 68L/Q/S, 89L, 90A/V, 98A, 129A/V/G, 151E/Q/R/T, 160A/L, 194A/S, 221I/V, 227A/F, 229A/Q, 230A, 234L/V/I, 282L/V/Q, 322A/P, 327A/L/V/G/M, 334L/S/V/I, 338A/I/L/V/M; o
- 10 ii. el mutante es un receptor de adenosina mutante que, en comparación con el correspondiente receptor de adenosina de tipo salvaje, tiene al menos el reemplazo de un aminoácido en una posición que, cuando se utilizan MacVector y CLUSTALW, se alinea en una cualquiera o más de las siguientes posiciones según la numeración del receptor de adenosina A_{2a} humano tal como se establece en la SEQ ID NO: 5: G114, G118, L167, A184, R199, A203, L208, Q210, S213, E219, R220, S223, T224, Q226, K227, H230, L241, P260, S263, L267, L272, T279, N284, Q311, P313, K315, A54, V57, H75, T88, T119, K122, G123, P149, E151, G152, A204, A231, L235, V239, y, en donde, después de su reemplazo, la identidad del residuo de aminoácido en la posición alineada según la numeración del receptor de adenosina A_{2a} humano tal como se establece en la SEQ ID NO: 5 es la siguiente: 114A, 118A, 167A, 184L, 199A, 203L, 208A, 210A, 213A, 219A, 220A, 223A, 224A, 226A, 227A, 230A, 241A, 260A, 263A, 267A, 272A, 279A, 284A, 311A, 313A, 315A, 54L, 57A, 75A, 88A, 119A, 122A, 123A, 149A, 151A, 152A, 204L, 231L, 235A, 239A; o
- 15 iii. el mutante es un receptor de neurotensina mutante que, en comparación con el correspondiente receptor de neurotensina de tipo salvaje, tiene al menos el reemplazo de un aminoácido en una posición que, cuando se utilizan MacVector y CLUSTALW, se alinea en una cualquiera o más de las siguientes posiciones según la numeración del receptor de neurotensina de rata tal como se establece en la SEQ ID NO: 9: A356, H103, D345, A86, A385, Y349, C386, K397, H393, I116, F358, S108, M181, R392, D113, G209, L205, L72, A120, P399, Y351, V268, T207, A155, S362, F189, N262, L109, W391, T179, S182, M293, L256, F147, D139, S100, K176, L111, A90, N270, A69, A73, V165, E166, G215, V229, M250, I253, A177, R183, I260, T279, T294, G306, L308, V309, L310, V313, F342, V360, N370, S373, F380, P389, G390, R395, y, en donde, después de su reemplazo, la identidad del residuo de aminoácido en la posición alineada según la numeración del receptor de neurotensina de rata tal como se establece en la SEQ ID NO: 9 es la siguiente: 356L, 103A, 345A, 86L, 385L, 349A, 386A, 397A, 393A, 116A, 358A, 108A, 181A, 392A, 113A, 209A, 205A, 72A, 120L, 399A, 351A, 268A, 207A, 155L, 362A, 189A, 262A, 109A, 391A, 179A, 182A, 293A, 256A, 147A, 139A, 100A, 176A, 111A, 90L, 270A, 69L, 73L, 165A, 166A, 215A, 229A, 250A, 253A, 177L, 183A, 260A, 279A, 294A, 306A, 308A, 309A, 310A, 313A, 342A, 360A, 370A, 373A, 380A, 389A, 390A, 395A;

en donde cuando una sustancia diana se une a dicho GPCR mutante, se produce una señal detectable; y

en donde la sustancia diana es un péptido, una proteína, un carbohidrato, un lípido, un ligando del GPCR, una molécula sintética, un fármaco, un metabolito del fármaco o un biomarcador de enfermedad.

2. Un biosensor según la reivindicación 1, en donde la señal detectable es cualquiera de un cambio de color; fluorescencia; evanescencia; resonancia de plasmones superficiales; conductancia eléctrica o separación de cargas; absorción ultravioleta, visible o infrarroja; luminiscencia; quimioluminiscencia; electroquimioluminiscencia; anisotropía de fluorescencia; intensidad de fluorescencia; vida útil de la fluorescencia; polarización de fluorescencia; transferencia de energía de fluorescencia; masa molecular; resonancia de espín electrónico; resonancia magnética nuclear; volumen o radio hidrodinámico; gravedad específica; centelleo; resistencia al efecto de campo; impedancia eléctrica; impedancia acústica; evanescencia cuántica; dispersión resonante; apantallamiento fluorescente; espectroscopía de correlación de fluorescencia; carga acústica; velocidad de onda cortante acústica; fuerza de unión; o tensión interfacial.

3. Un biosensor según la reivindicación 1 o 2, en donde el biosensor es un biosensor basado en el flujo, tal como un biosensor de microbalanzas de cristal de cuarzo, un biosensor de ondas evanescentes, un biosensor de guía de ondas planas, un sensor Raman de superficie o un biosensor de resonancia de plasmón superficial.

4. Un biosensor según cualquier reivindicación anterior, en donde el biosensor está en una forma soportada en chips o micropelículas.

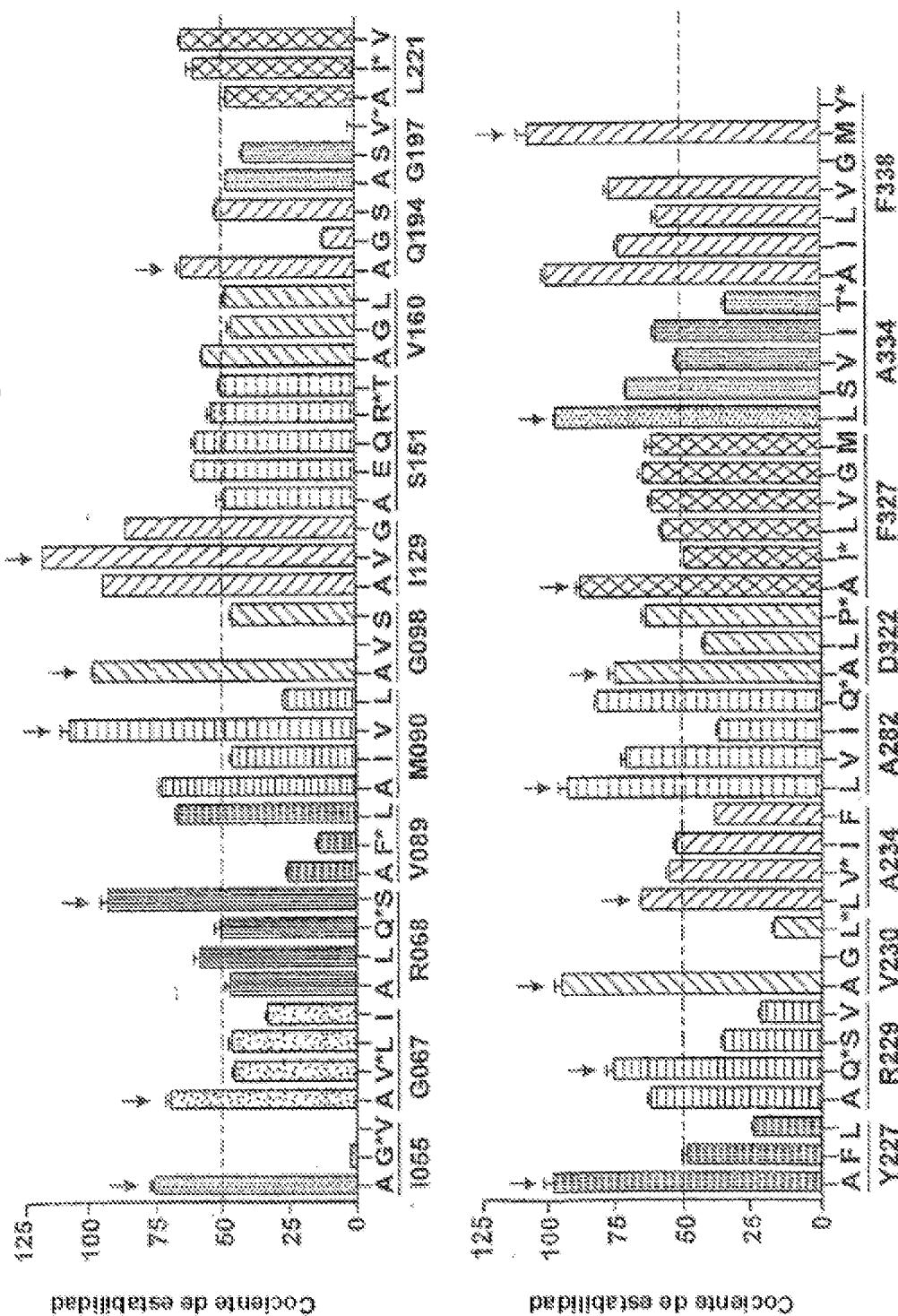
5. Un biosensor según cualquier reivindicación anterior, en donde:

55 cuando el GPCR mutante tiene una vida útil prolongada de una conformación agonista, el GPCR mutante se une al agonista con la misma o mayor afinidad que el GPCR humano de tipo salvaje, opcionalmente en donde el agonista es el agonista natural; y

cuento el GPCR mutante tiene una vida útil prolongada de una conformación antagonista, el GPCR mutante se une al antagonista con la misma o mayor afinidad que el GPCR humano de tipo salvaje, opcionalmente en donde el antagonista es el antagonista natural.

- 5 6. Un biosensor según cualquier reivindicación anterior, en donde el GPCR mutante tiene de 1 a 10 aminoácidos reemplazados en comparación con el GPCR humano de tipo salvaje, contribuyendo por sí mismos cada uno de los 1 a 10 aminoácidos reemplazados a aumentar la termoestabilidad conformacional.
- 10 7. Un biosensor según cualquier reivindicación anterior, en donde el GPCR mutante es al menos 2 °C más estable, al menos 5 °C más estable, al menos 8 °C más estable, al menos 10 °C más estable, al menos 15 °C más estable o al menos 20 °C más estable que su GPCR humano de tipo salvaje.
- 10 8. Un método para producir un biosensor según la reivindicación 1, comprendiendo el método:
 - a) proporcionar dicho GPCR mutante; y
 - b) inmovilizar el GPCR mutante sobre un soporte sólido para su incorporación a un biosensor.
9. El método de la reivindicación 8, en donde los GPCR mutantes se inmovilizan mediante una reconstitución superficial mediada por flujo.
- 15 10. El método de la reivindicación 8 o 9, en donde los GPCR mutantes están inmovilizados en un chip o perla.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde el GPCR mutante se proporciona en una forma que está unida a un detergente o lípido.
12. El biosensor de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde el GPCR mutante se expresa en *Escherichia coli*.

Fig. 1



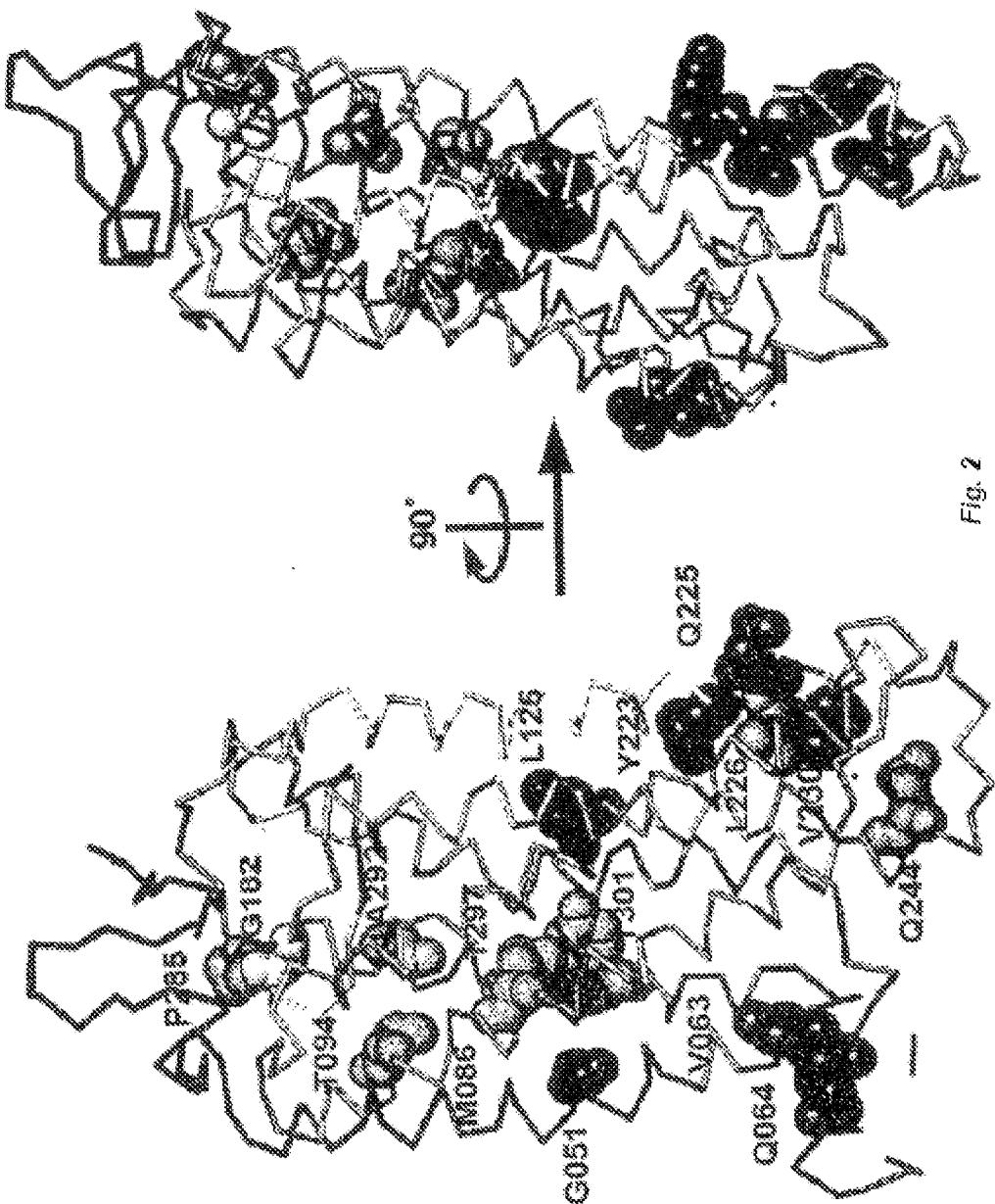
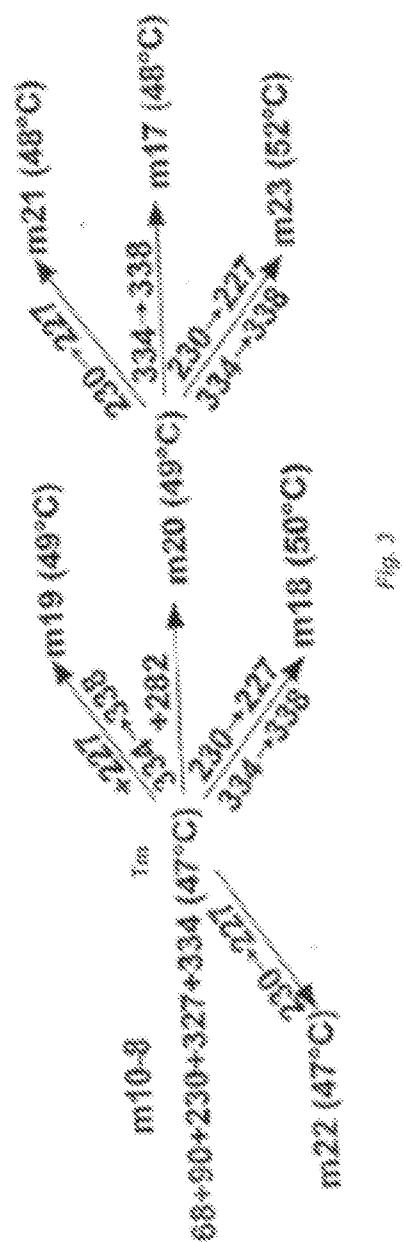


Fig. 2



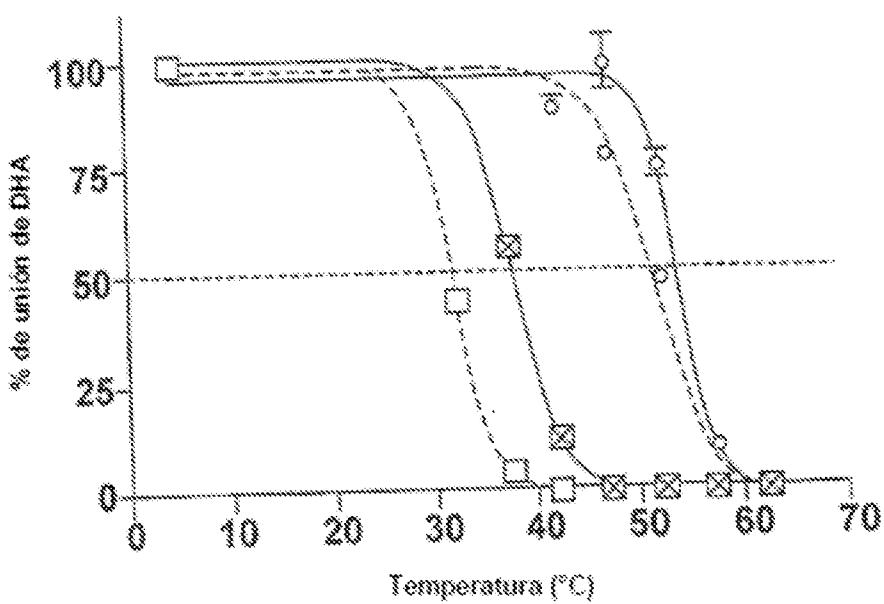


Fig. 4

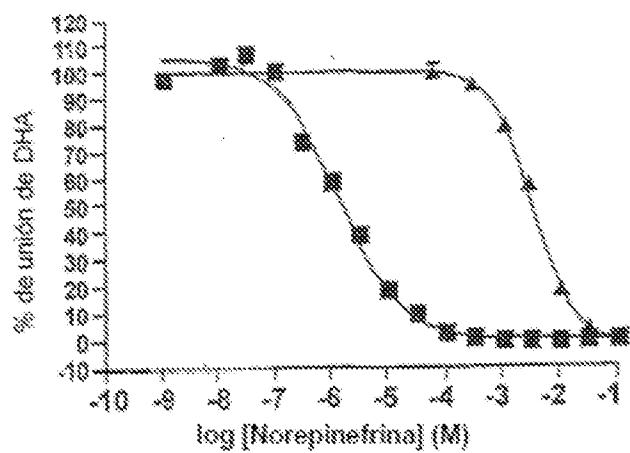


Fig. 5a

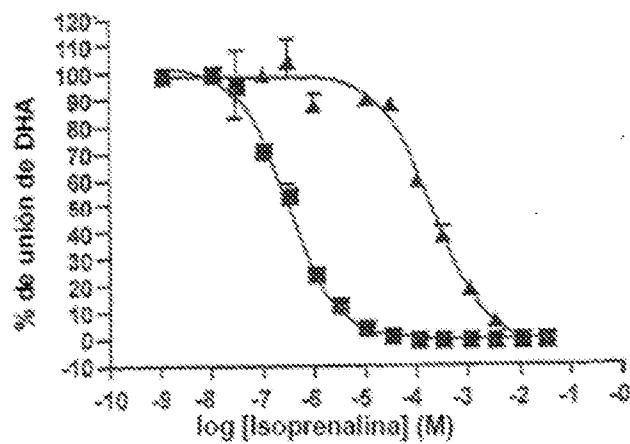


Fig. 56

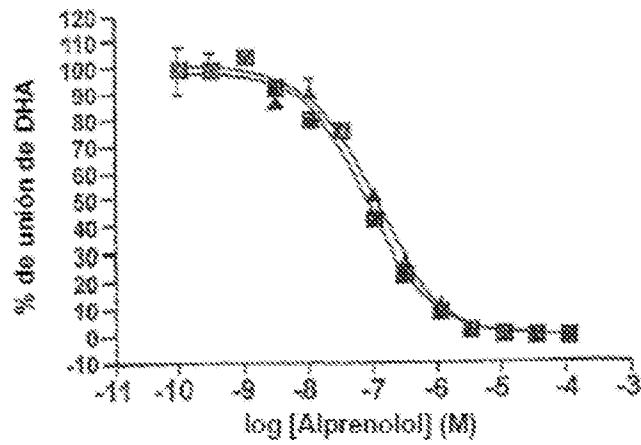


Fig. 5c

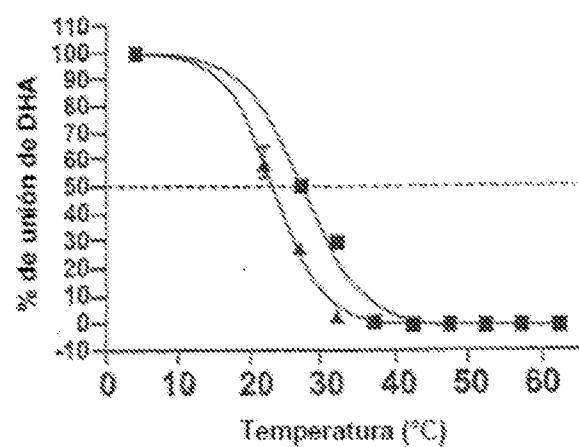


Fig. 6a

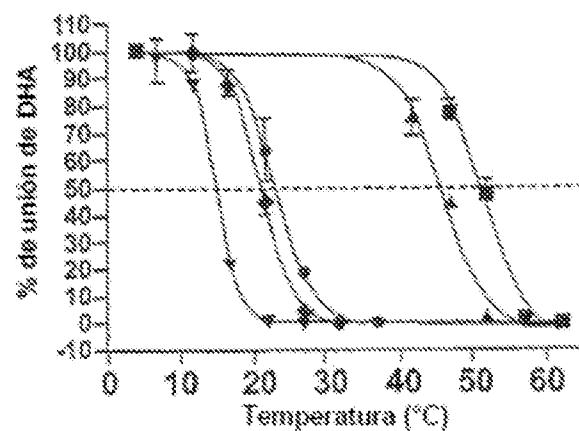


Fig. 6b

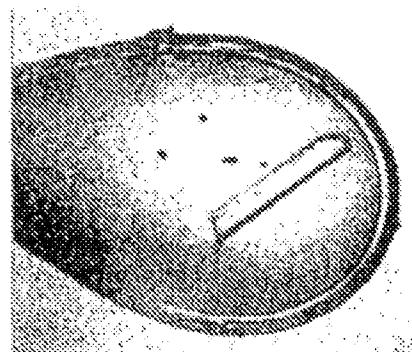


Fig. 6c

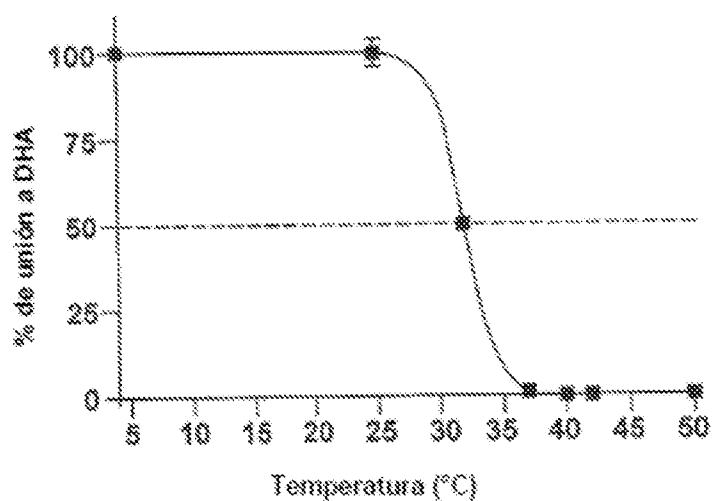


Fig. 7

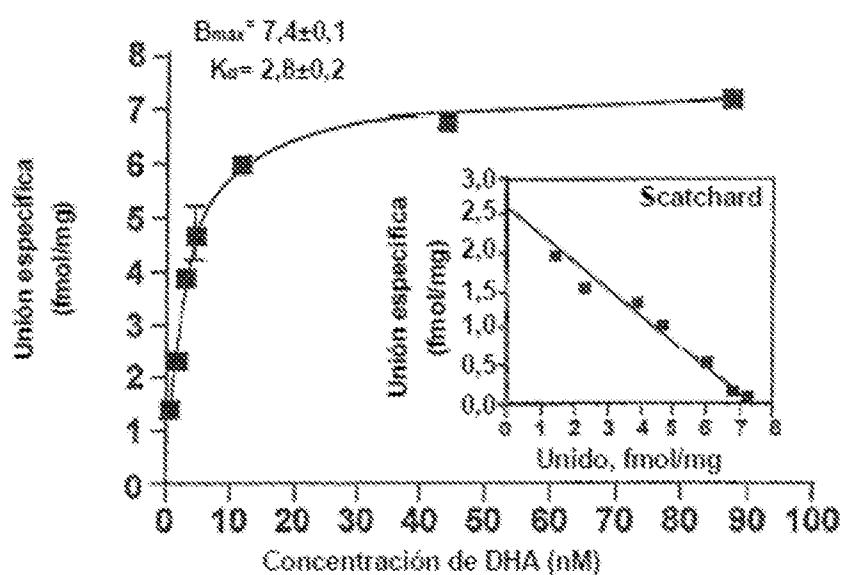


Fig. 8a

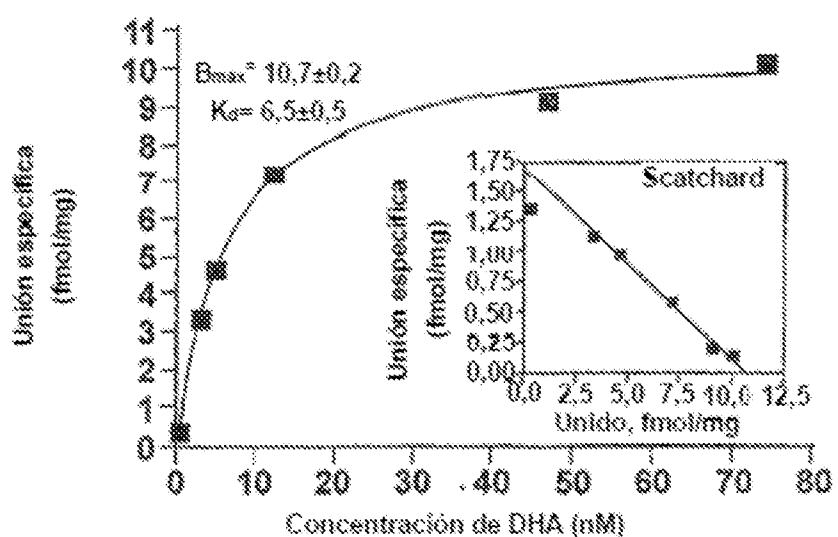


Fig. 8b

Alineación del receptor β -adrenérgico de pavo con $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ humanos

Fig. 9 (Página 1 de 2)

adrb1_melga	359	FPRKADRRILHAGCQPAAPLGCGFISTLGSPEHSPGGTWSDCNGGTRGGSES	408
adrb1_humano	393	CARRAARRRHATHGDRPR-----	423
adrb2_humano	342	LRRSSSLNAYGNG-----YS-----SNGNTGEQSG---	365
adrb3_humano	362	RCGRRLP-----PEP-----CAAARPALFPS	382
adrb1_melga	409	SLEERHSKTSRSESKMEREKNILATTRFYCTFLGNQDKAVFCTVLRIYKL	458
adrb1_humano	424	PGAAASDDDO-----DDVVCATPPARLLEPKACCNCGAAADSDSSLDW	465
adrb2_humano	366	----YHVEQ-----EKENK-----LLCEDLPGTEDFVGHQGTVPSON	398
adrb3_humano	383	GVPAARS-----SPAQPRLCQRLLDGASWGVS	408
		.	
adrb1_melga	459	FEDATCTCPRTNHILKMKWKEFKQHQ	463
adrb1_humano	466	PCRPGEFASESKV	477
adrb2_humano	399	IDSQGRNCSTNDELL	413
adrb3_humano	409		408

CONSULTE A CONTINUACIÓN LA CLAVE



- Posición de las mutaciones en m23
- Posición de otras mutaciones termoestabilizadoras
- ▨ Posición de dominios transmembrana
- ▢ Posición de la hélice 8

Cuando otras sustituciones de aminoácidos proporcionaron una termoestabilidad significativa, la posición se marca con una letra en minúscula y las mutaciones se enumeran a continuación en orden de termoestabilidad decreciente.

- a. R68S
- b. V69L
- c. N90Y, A
- d. I128V, A, C
- e. S151E, Q
- f. L221V, I
- g. K229Q, A
- h. A282L, V, Q
- i. D322R, E
- j. P327A, G, H, V
- k. A334L, S, I
- l. F338M, A, V, I

Fig. 9 (Página 2 de 2)

Alineación de los receptores de adenosina humanos

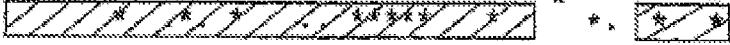
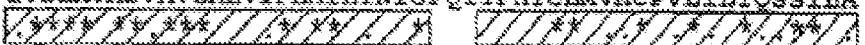
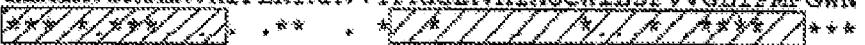
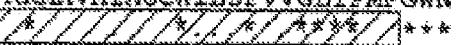
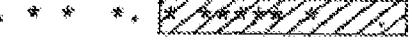
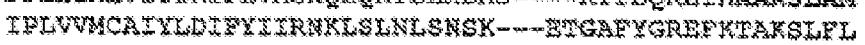
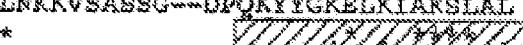
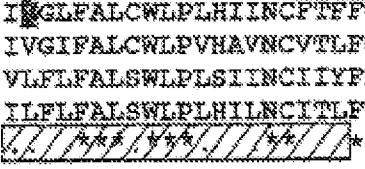
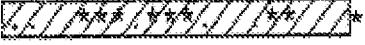
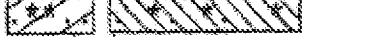
AA2AR_humano	1	MPIMGSSVYITVELAIAVLAILGNVLVCWAVWLNSNLQNVTPNYF	44
AA2BR_humano	1	MILETQDALVVALELVIALLSVAGNVLVCAAVGTANTLQQTPTNYF	45
AA3R_humano	1	MPNNSTALSLANVTYITMEIFIGLCAIVGNVLVICVVKLNPSLQTTTFYF	50
AA1R_humano	1	MP----PSIISAFQAAAYIGIELEVLLALVSVPGNVLVIVAWAVXVNQALRDATEFCF	47
			
		* . 	
AA2AR_humano	45	VVSLAAADINVG Q LAIPPAITISTGFCAC C GCLFIACFVLV L QSSIFS	94
AA2BR_humano	46	LVSLLAARDVAVGLFAIPPAITISLGFC T DFTYGCLFLACFVLV L QSSIFS	95
AA3R_humano	51	IVSLALADIAVGVLVNPLAIVVSLIGITINFY S CLMTCLLLIFTHASIMS	100
AA1R_humano	48	IVSLAVADVAVGALV I PLAILINIGPQTTFHTCLMVA C FVL L ITQSSILA	97
			
		■ ■	
AA2AR_humano	95	LLAIIAIDRYIAIRIPLRYNGLVTG R ARG A IIACWVLSFAIGLTPMLGWN	144
AA2BR_humano	96	LLAVAVDRLYLAICVPLRYKSLVTG T RARGVIAVLWVLA F GI G LTPFLGWN	145
AA3R_humano	101	LLAIAVDRLRVKLT V RYKRVTT H RRRIW L ALGLC W LVSFLVGL T PMFGWN	150
AA1R_humano	98	LLAIAVDRLRV K IP L RYK M V V TY R RAAV A IA C GW L S F V V GL T PMFGWN	147
			
		*** . *  ***	
AA2AR_humano	145	-----NC G Q E P K E K NHS Q G C E G Q VAC I F E D V V P M N Y M V Y F N F F A C V L	187
AA2BR_humano	146	SKDSATNNCTEPWDGTTNESCC----LVKCL F E N V V P M S Y M V Y F N F F C V L	192
AA3R_humano	151	-----MKLTSEYHRNVT-----FLSCQFVSVMRMDYM V Y P S F L P W I F	187
AA1R_humano	148	-----NLSAVERAWAANGSM G E P V I K C E F K V I S M E Y M V Y F N F F V W L	190
		. * * . 	
AA2AR_humano	188	VPLILMLGVYLRIFL A RRQLKOMESQPLPGERARSTL Q KEV H D A X S D A I	237
AA2BR_humano	193	PPLIIMLV I YIKI I PLV A CRQL Q RT E L M D H S ----RT T L Q R E I H A K S L A I	238
AA3R_humano	188	IPLVV M C A I Y L D I F Y I I R N K L S L N S K ---ETGAFY G R E P K A K S L F L	234
AA1R_humano	191	PPLIIMV L I T L E V P Y L R K Q L N K V S A S G ---DPOKY Y G K E L K I A N S L A I	238
			
		. * 	

Fig. 10 (Página 1 de 2)

AA2AR_humano	238	I  GLFALCWLPFHIIINCPTFFCPDCS-HAFLNLNYIAIVLSHITNSVVNPF	286
AA2BR_humano	239	IVGIFALCWLPVHAVNCVTLFQPAQGKNEPKWAMMMAILLSHANSVVNPI	288
AA3R_humano	235	VLFIFALSWLPLSIINCIIYFNG-----EVPOQLVLYMGILLSHANSMMNPI	280
AA1R_humano	239	ILFIFALSWLPLHILNCITLFCPSC--HKPSILTYIAIFLTHGNSAMNPI	286
			*
AA2AR_humano	287	IYAYRIREFRQTFRKIIRSHVLRQQEPFKAAAGTSARVLAAGSDGEQVSL	336
AA2BR_humano	289	VYAYRNRRDPRTYTFHKIISRYLLCQ-----ADVKGNGQAGVOPAL	326
AA3R_humano	281	VYAYKIKRFKETYLILKACVVCHP-----SDSLDTSIERNSE	318
AA1R_humano	287	VYAFRIOKERVTTELKIKNDHFRCQP-----APPIODELPEERPDD	326
			.
AA2AR_humano	337	RLNCHPPCVWANGSAPHERRPNNGYALGVSGCSAQESQGNTGLPDVELL	386
AA2BR_humano	329	GVCL	332
AA3R_humano	319		318
AA1R_humano	327		326
AA2AR_humano	387	SHELKGVCPPEPPGLRDPFLAODGAGVS	412
AA2BR_humano	333		332
AA3R_humano	319		318
AA1R_humano	327		326



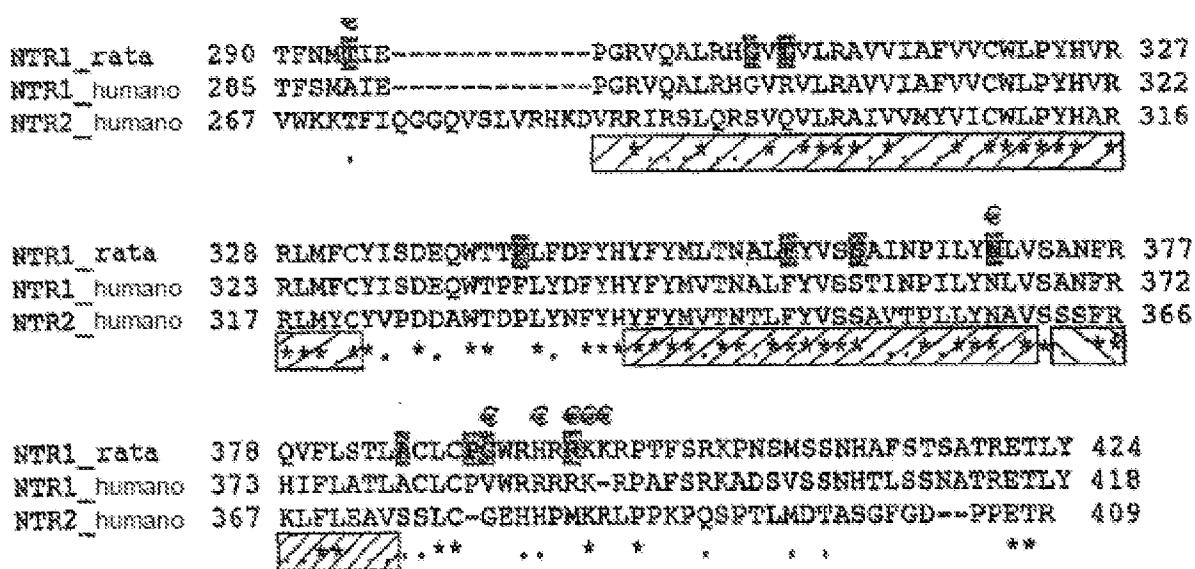
- A Mutaciones determinadas por unión de agonista
- B Mutaciones determinadas por unión de antagonista
- C Posición de dominios transmembrana
- D Posición de la hélice 8

Fig. 10 (Página 2 de 2)

Alineación de los receptores de neuropeptido Y

NTR1_rata	1	MHLNSSVPQGTPGEPOAQPFSGPQSEMEATFLALSLNGSGNTSESDTAG	50
NTR1_humano	1	MRLNSSAP-GTPGTPAADPFQRAQAGLEEARLAPGFGNAAGNASERVLAA	49
NTR2_humano	1	METSSP--RPPRPSSNPG-----	16
	.	*** * * * *	
NTR1_rata	51	PNSQLDVNTDIYSKVLVITIYI[RE]FVVGTVGNSVT[RE]FTL[RK]KSLQSLQS	100
NTR1_humano	50	PSSELDVNTDIYSKVINTAVYLALFVVGTVGNTVTAFTLARXKSLQSLQS	99
NTR2_humano	19	LDARLGVDTRLNAKVLFTALYALINALGARGNALSVHVKAR---AGRAG	66
	.	*** [RE]FVVGTVGNSVT[RE]FTL[RK]KSLQSLQS	.
NTR1_rata	101	T[V][RE]HNLGSLALS DLLL LLLAMPVELYINF INVHHWAFGDAGCRGYYFLRD	150
NTR1_humano	100	TVH[H]NLGSLALS DLLL LLLAMPVELYINF INVHHWAFGDAGCRGYYFLRD	149
NTR2_humano	67	RLRHHVLSLALAGL LLLL VGPVELYSFVWFHYPWVF GDLGCRGYYFVHE	116
	[RE]	RLRHHVLSLALAGL LLLL VGPVELYSFVWFHYPWVF GDLGCRGYYFVHE	
NTR1_rata	151	ACTYAT ALNVASLS[RE]ERYLAICHPPK[RE]KTLMS[RE]SRTKKFISAIWL ASALL	200
NTR1_humano	150	ACTYAT ALNVASLS[RE]ERYLAICHPPKAKTLMSRSRTKKFISAIWL ASALL	199
NTR2_humano	117	LCAYATVLSVAGLSAERCCLAVCOPLRARSILTPRRTRNLVALSWAASLGL	166
	[RE]	LCAYATVLSVAGLSAERCCLAVCOPLRARSILTPRRTRNLVALSWAASLGL	
NTR1_rata	201	AIPMLFTMGLQNR--SGDG-TNPGLVCTPIVDTATVKVVIQVNTFMSFL	247
NTR1_humano	200	AVPMLFTMGEQNR--SADG-QHAGGLVCTPTINTATVKVVIQVNTFMSFI	246
NTR2_humano	167	ALPMAYINGQKHELETADGEPEPASRVCTVLVSRTALCVPIQVNVLVSFV	216
	[RE]	ALPMAYINGQKHELETADGEPEPASRVCTVLVSRTALCVPIQVNVLVSFV	
NTR1_rata	248	FPMLVISILNTV[RE]ANKLTVMVHQAAEQ----G-----RVC[RE]VGTHNGLENS	289
NTR1_humano	247	FTPNVVISVLNTIIANKLTVMVRQAAEQ----G-----QVCTVGC----EHS	284
NTR2_humano	217	LPLALTAFLNGTVSHLLALCSQVPSTSTPCSSTPSRLELLSEEGLLSFI	266
	[RE]	LPLALTAFLNGTVSHLLALCSQVPSTSTPCSSTPSRLELLSEEGLLSFI	

Fig. 11 (Pàgina 1 de 2)



- A Mutaciones determinadas por calentamiento en ausencia de neurotensina
- B Mutaciones determinadas por calentamiento en presencia de neurotensina
- C Mutaciones que mejoran significativamente los niveles de expresión en E. coli
- D Posición de dominios transmembrana
- E Posición de la hélice 8

(a) H103: Termoestabilidad obtenida con A, N, S, V, L, M
Solo H103N y H103S proporcionaron niveles de expresión wt

Fig. 11 (Página 2 de 2)

Diagrama de flujo que muestra los dos formatos de ensayo diferentes de ligando(+) y ligando(-) utilizados para determinar la termoestabilidad del receptor

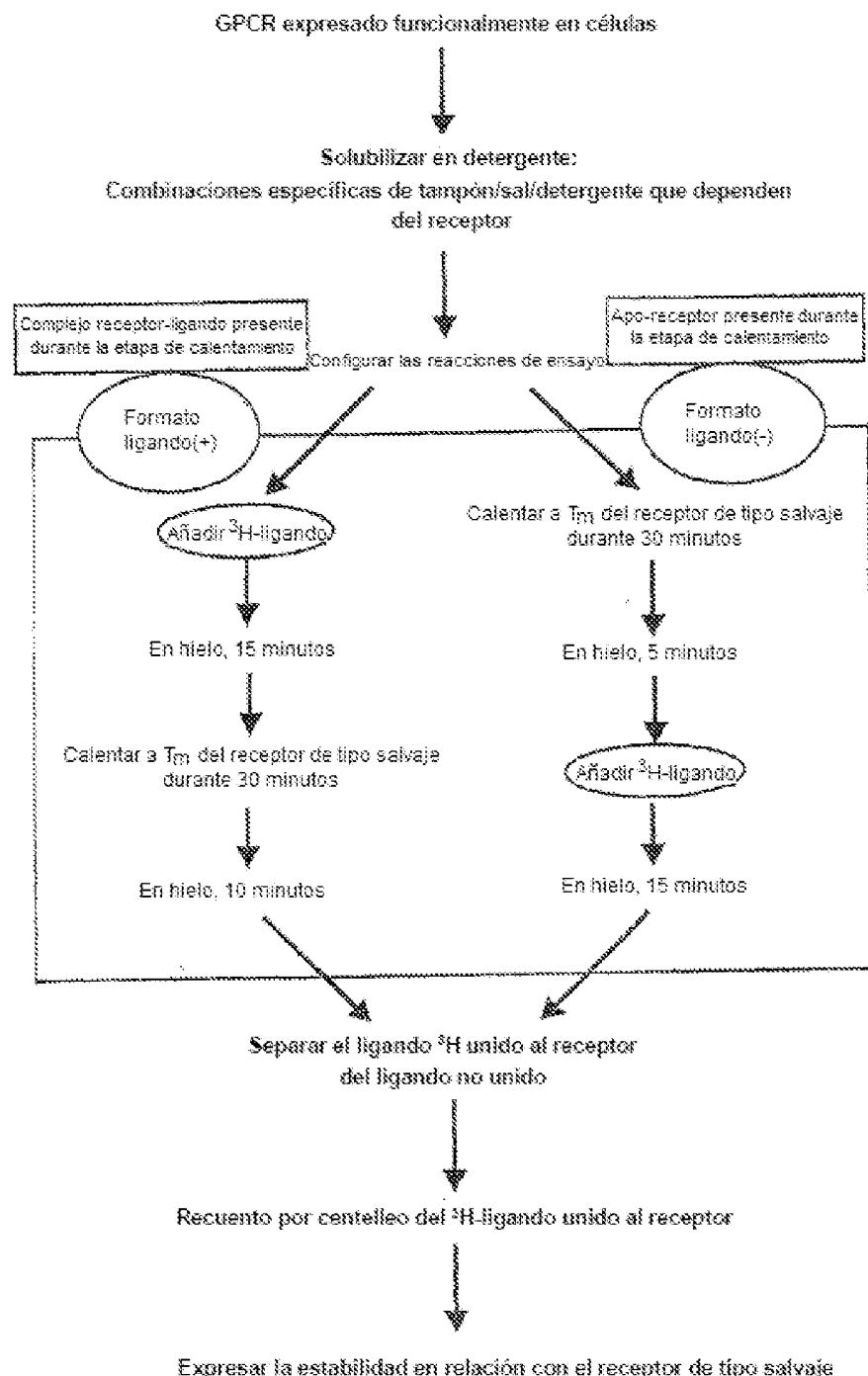


Fig. 12

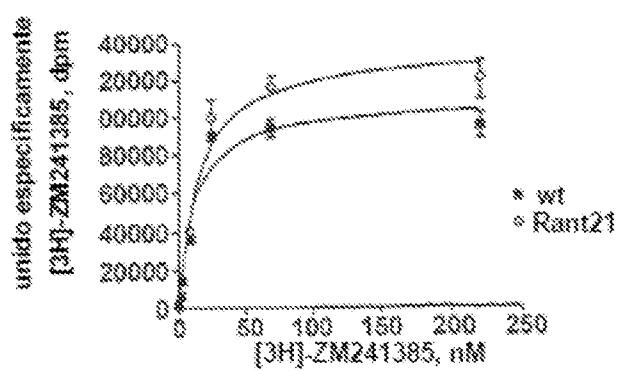


FIG. 13A

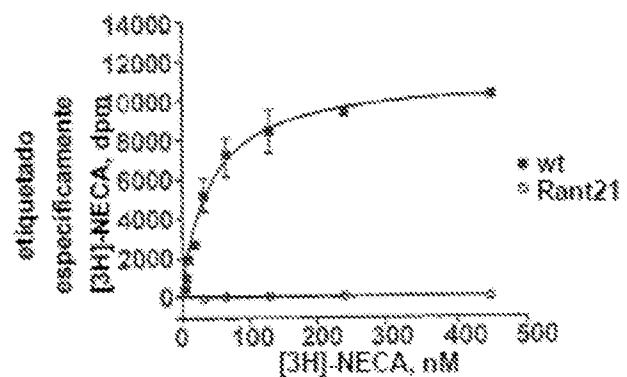


Fig. 13B

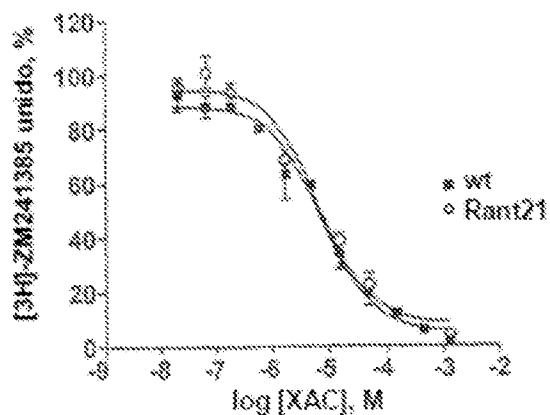


Fig. 13C

ES 3 006 458 T3

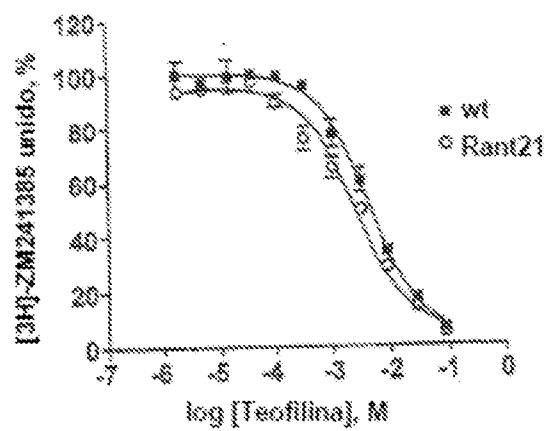


Fig. 13D

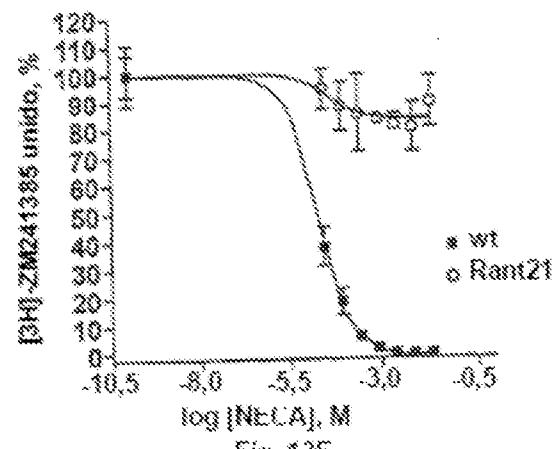


Fig. 13E

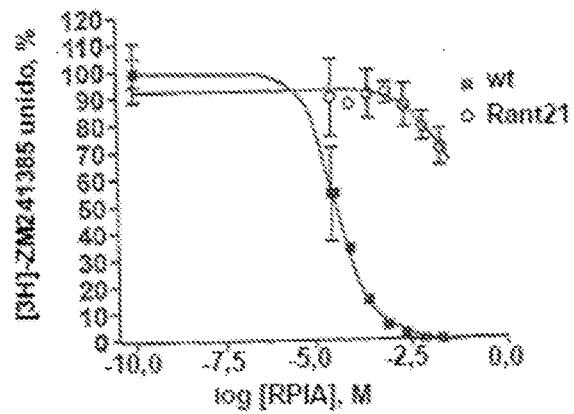


Fig. 13F

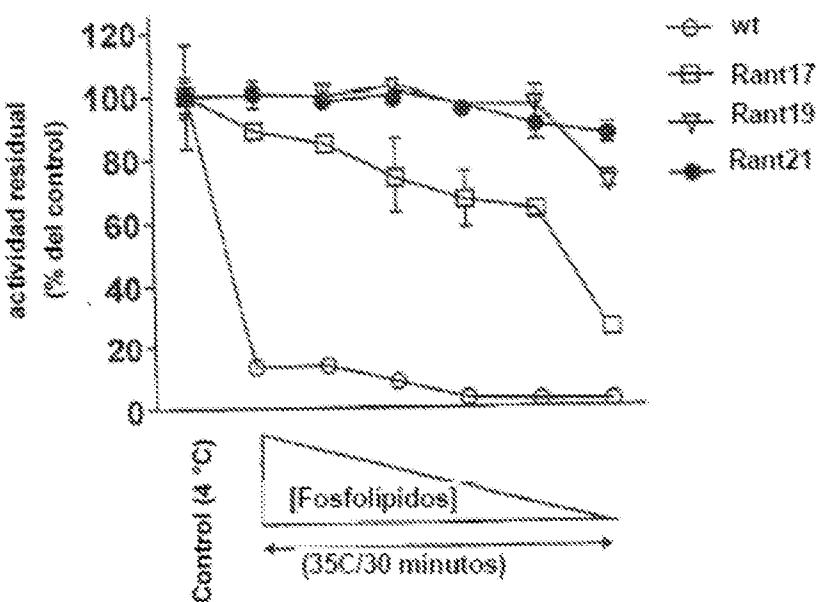


Fig. 14A

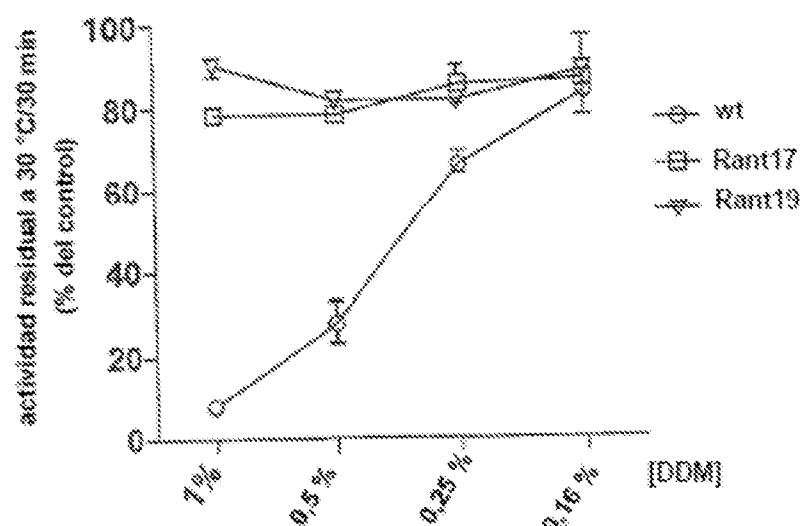
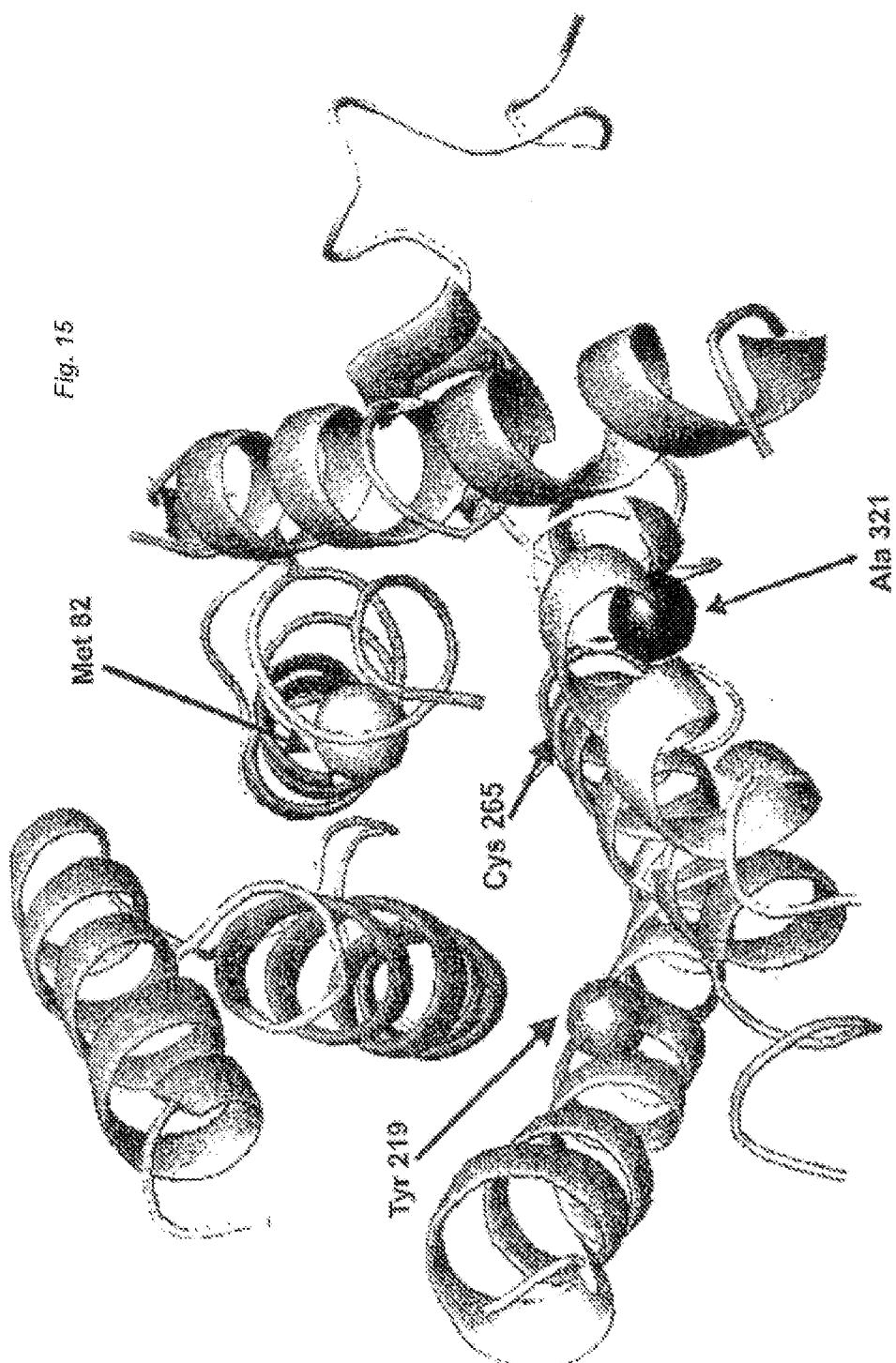


Fig. 14B



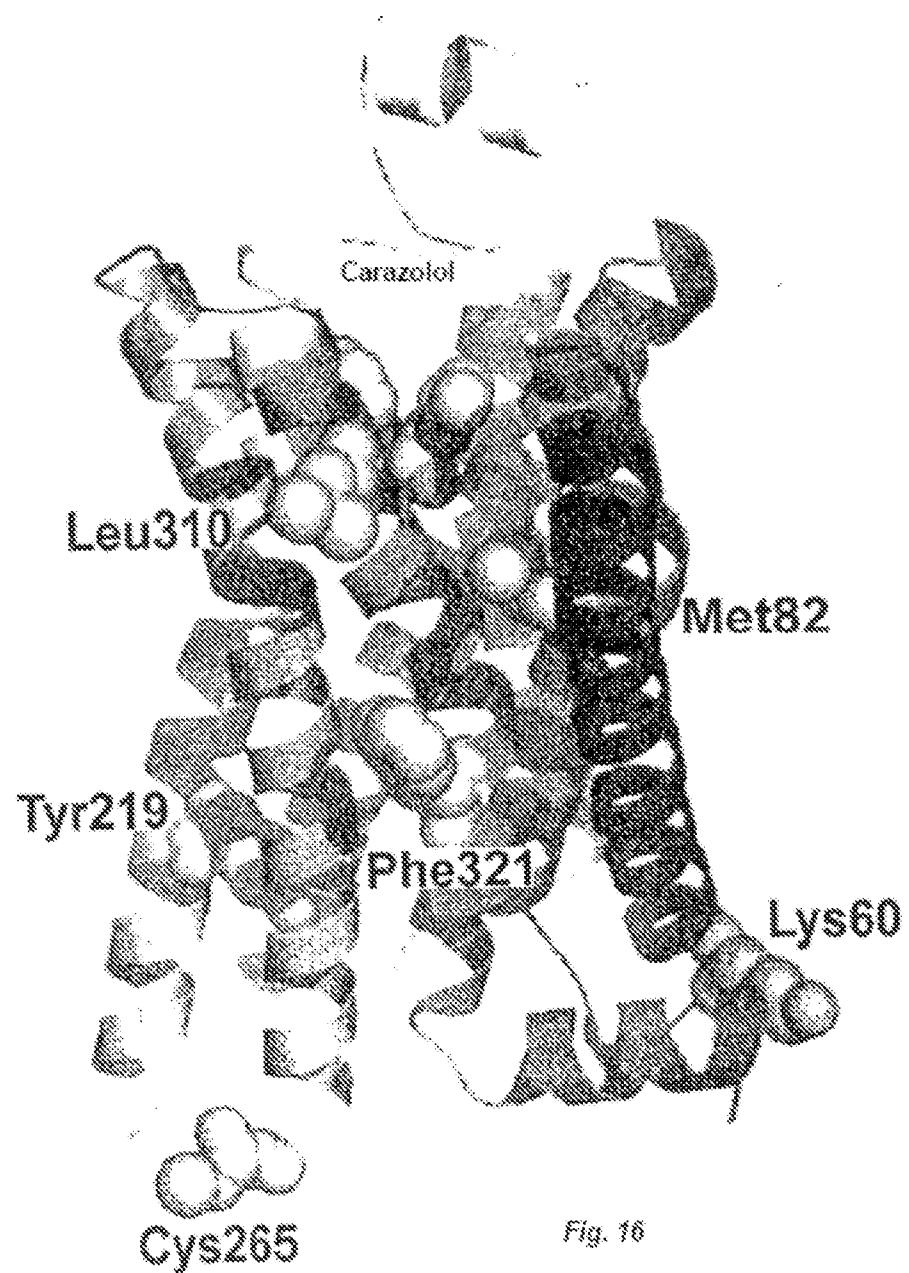


Fig. 16

ES 3 006 458 T3

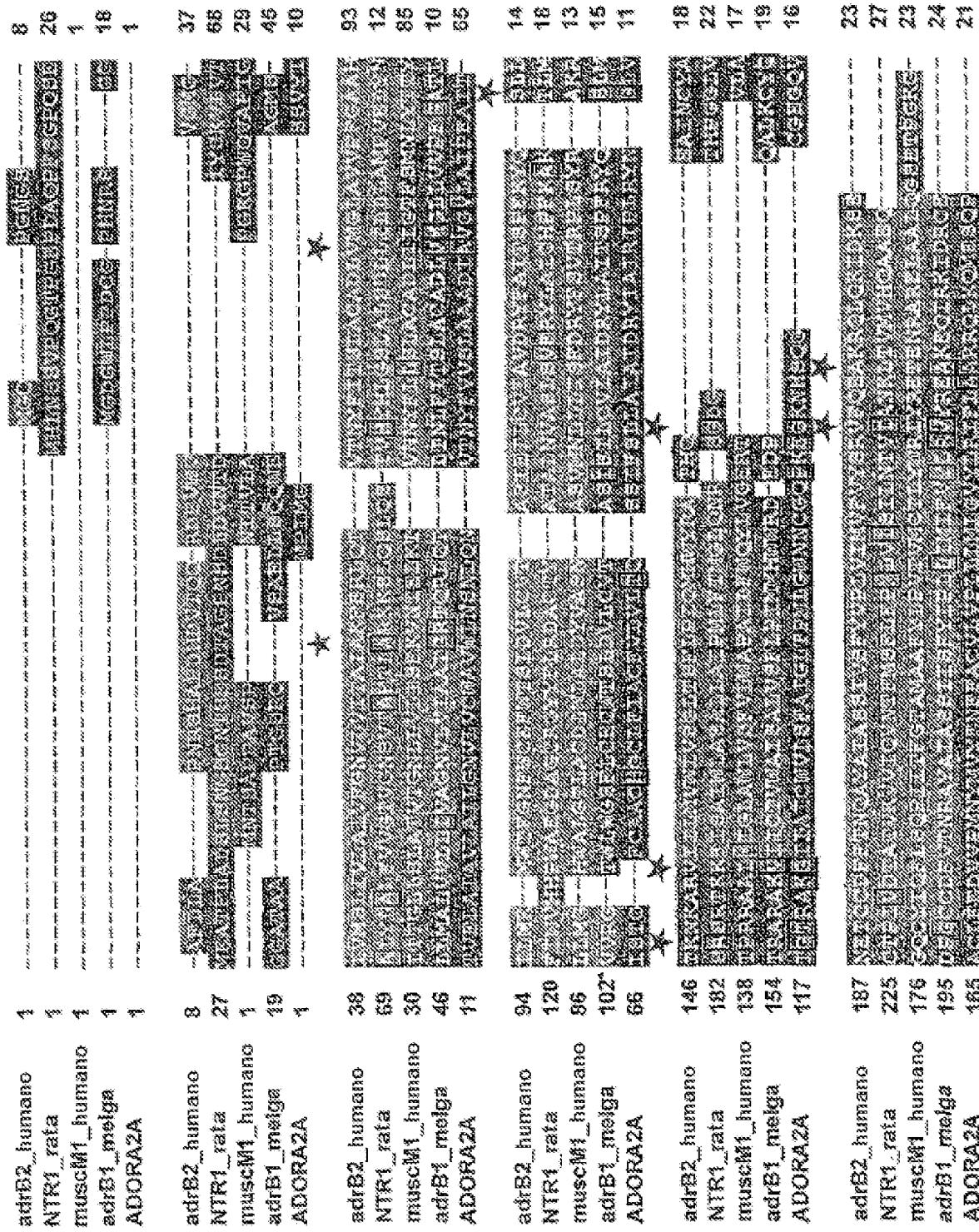


Fig. 17 (Página 1 de 3)

ES 3 006 458 T3

237	adrb2_humano	25		250		250		250		250		250		250	
274	NTR1_rata	29		293		293		298		298		298		298	
234	muscm1_humano	26		269		269		302		302		302		332	
245	adrb1_melga	26		265		265		215		215		215		215	
215	ADORAA2A	21		215		215		215		215		215		21	
250	adrb2_humano	27		298		298		302		302		302		312	
293	NTR1_rata	31		265		265		215		215		215		215	
269	muscm1_humano	37		215		215		215		215		215		215	
265	adrb1_melga	26		215		215		215		215		215		215	
215	ADORAA2A	21		215		215		215		215		215		215	
250	adrb2_humano	27		298		298		302		302		302		312	
298	NTR1_rata	31		265		265		215		215		215		215	
302	muscm1_humano	37		215		215		215		215		215		215	
265	adrb1_melga	26		215		215		215		215		215		215	
215	ADORAA2A	21		215		215		215		215		215		215	
250	adrb2_humano	27		298		298		302		302		302		312	
298	NTR1_rata	31		265		265		215		215		215		215	
302	muscm1_humano	37		215		215		215		215		215		215	
265	adrb1_melga	26		215		215		215		215		215		215	
215	ADORAA2A	21		215		215		215		215		215		215	

Fig. 17 (Página 2 de 3)

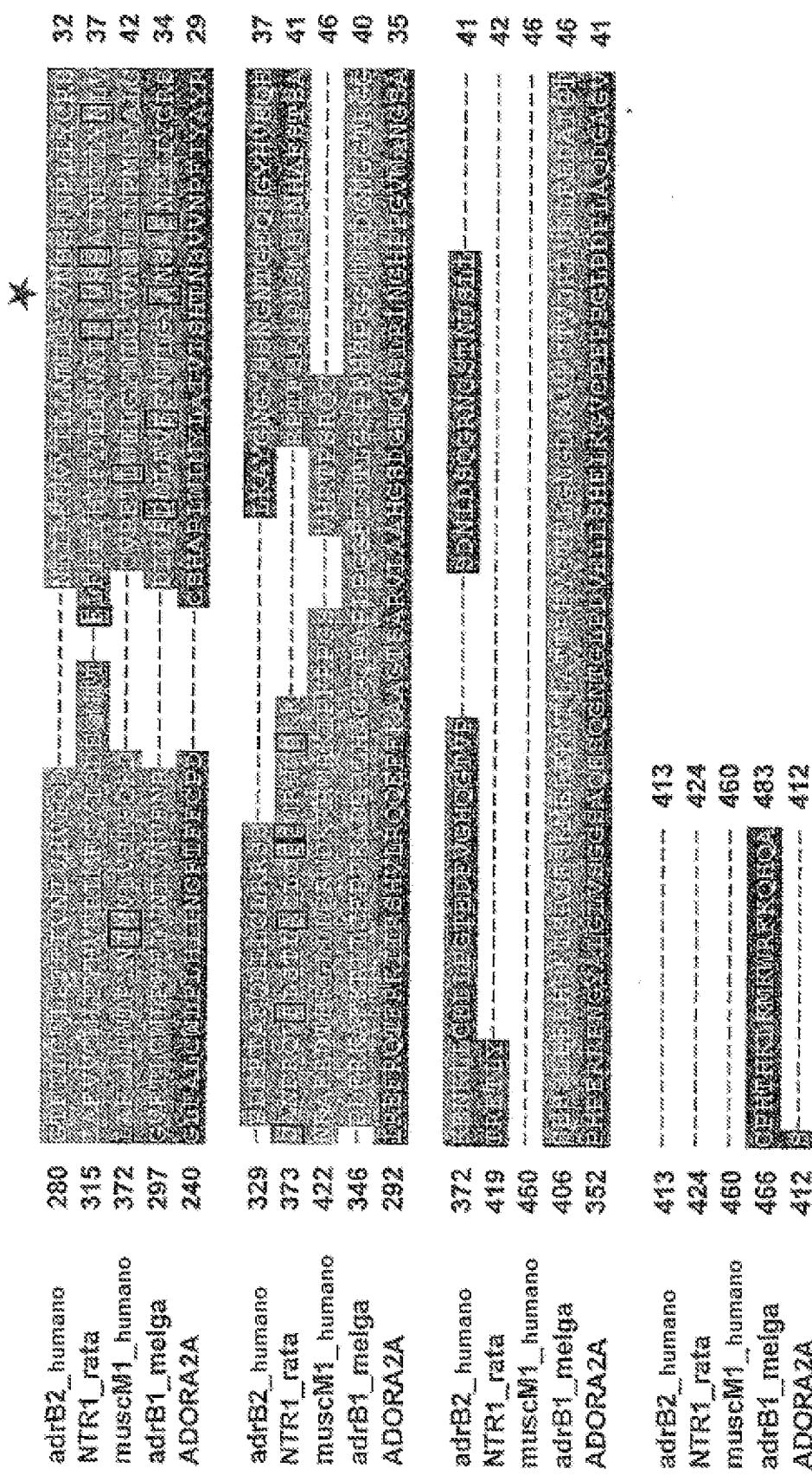


Fig. 17 (Página 3 de 3)

Fig. 18

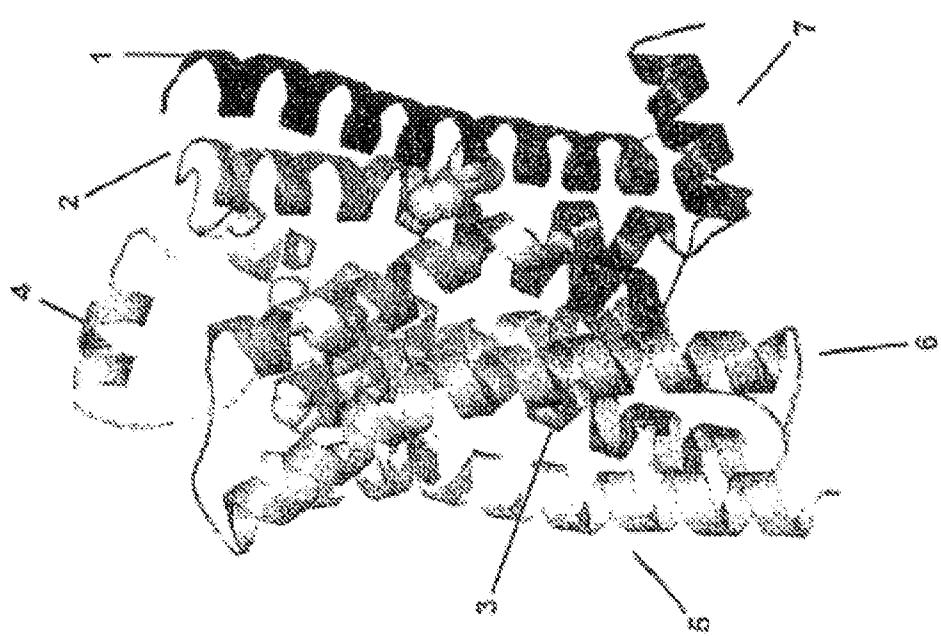
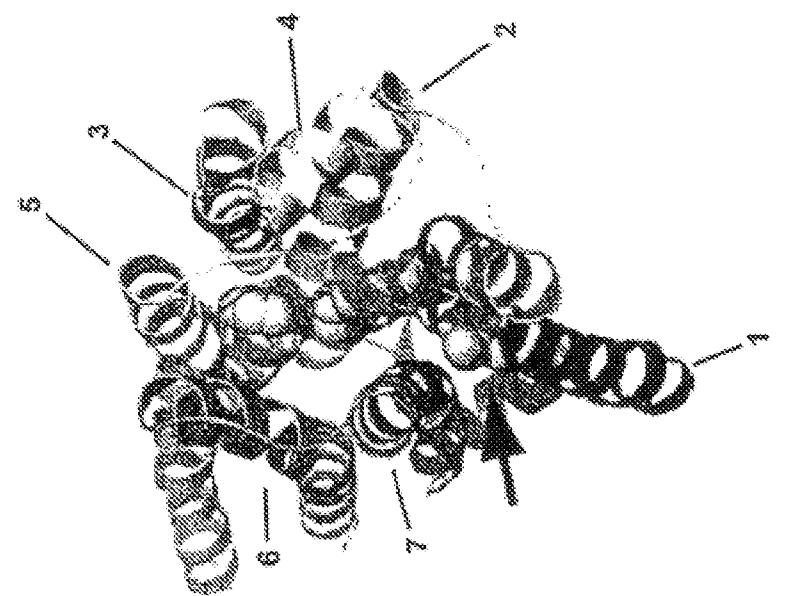
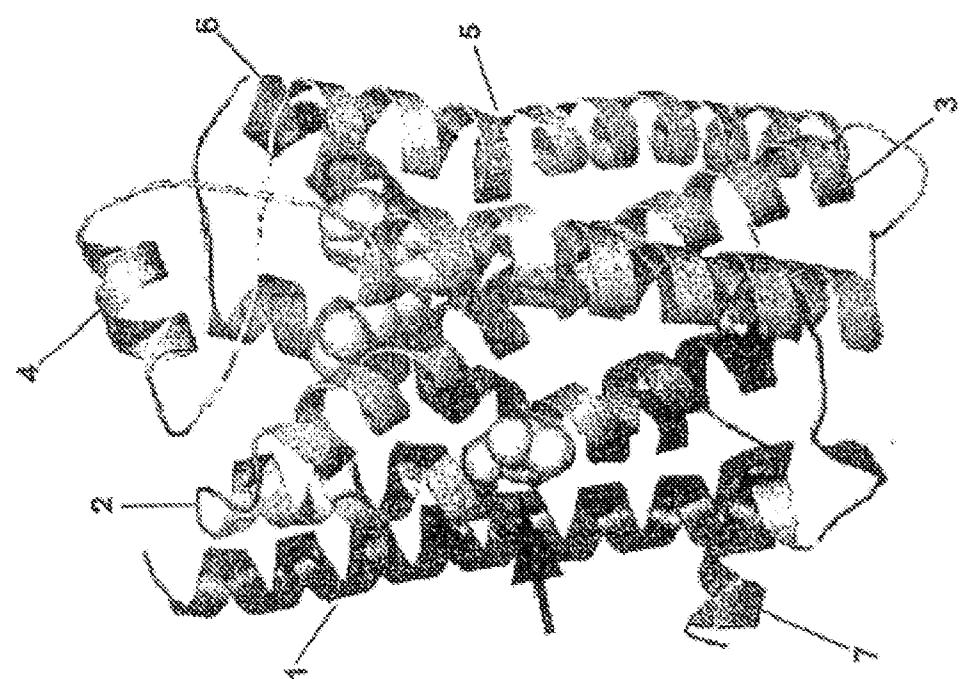
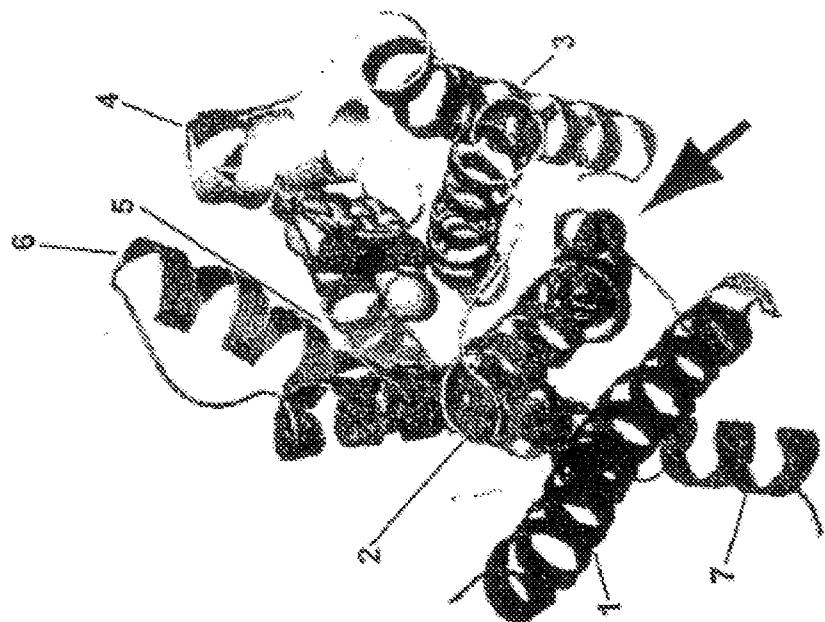


Fig. 13



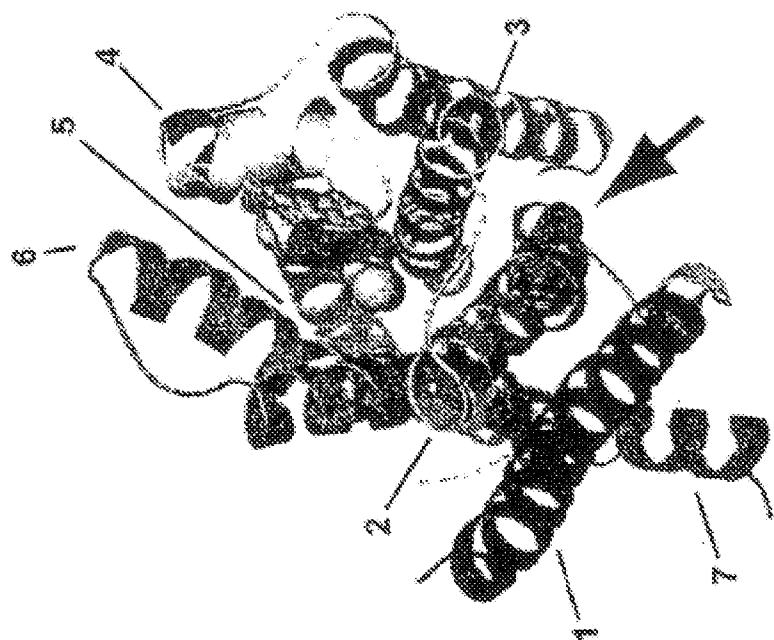
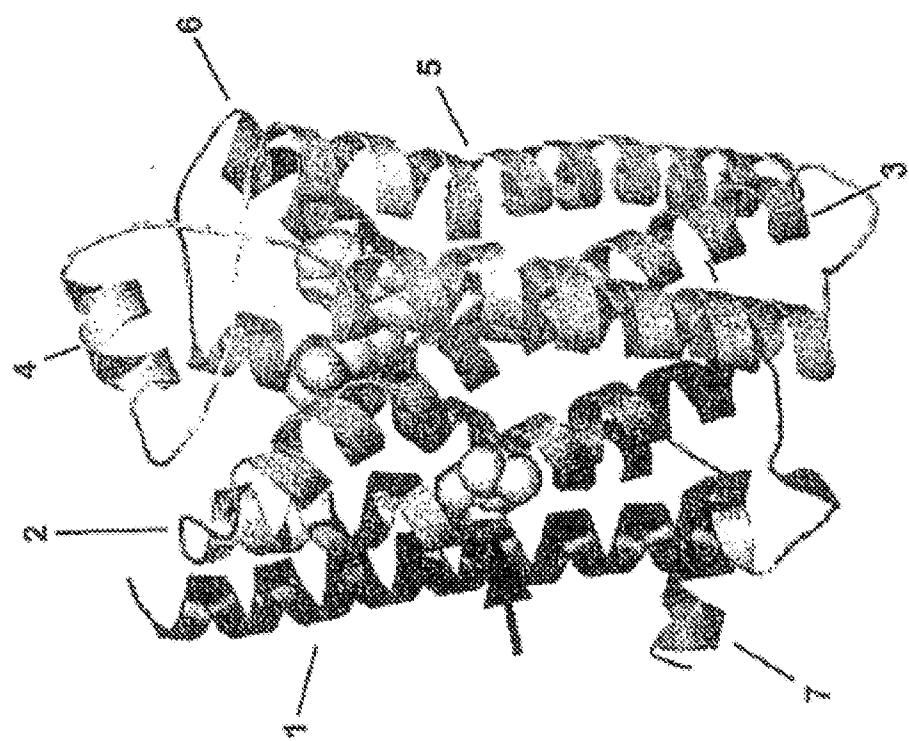


Fig. 29



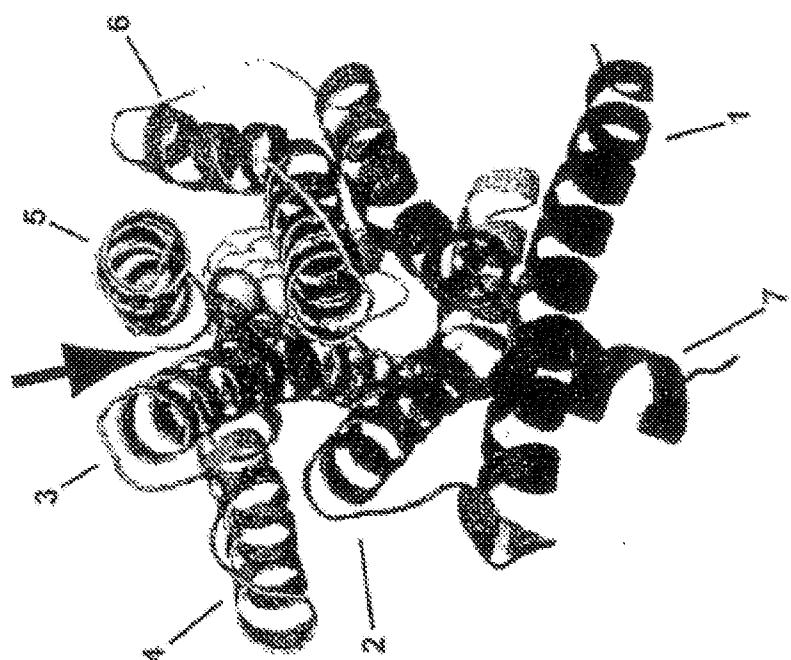
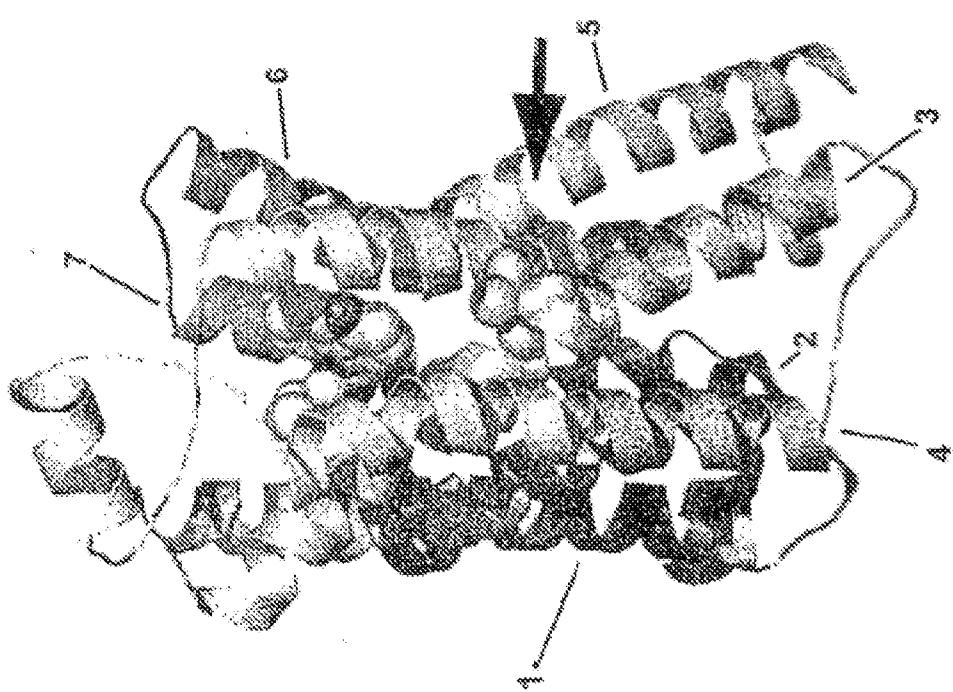


Fig. 21



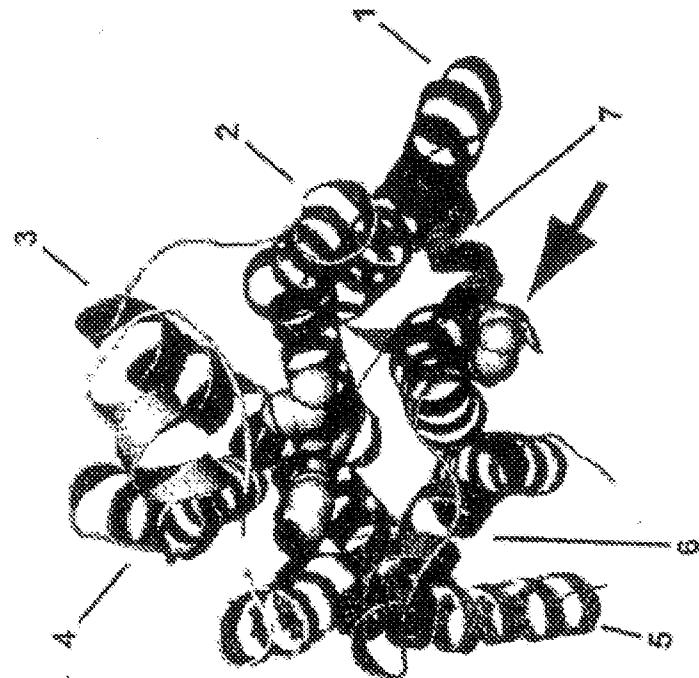


Fig. 22

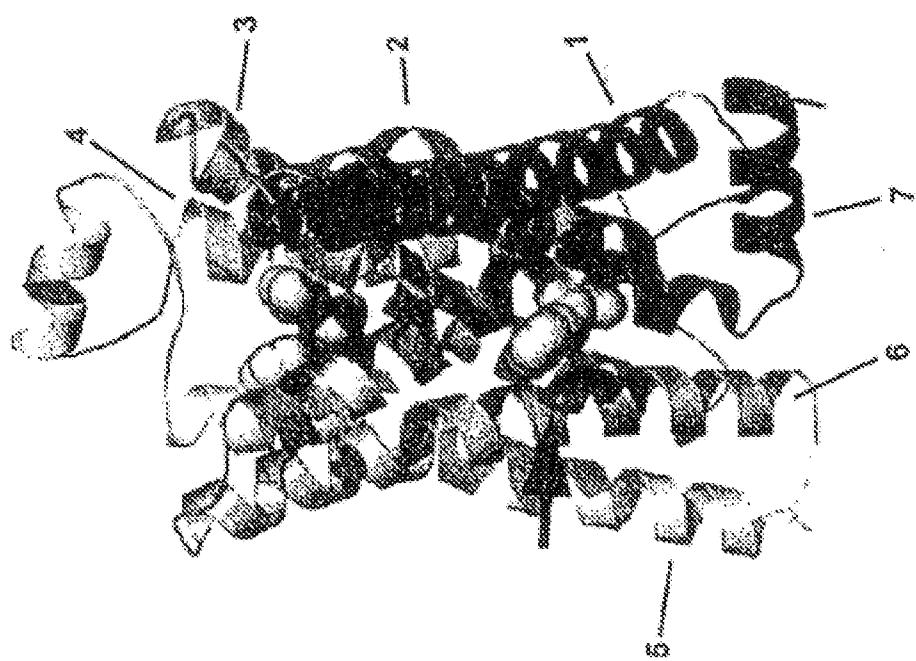
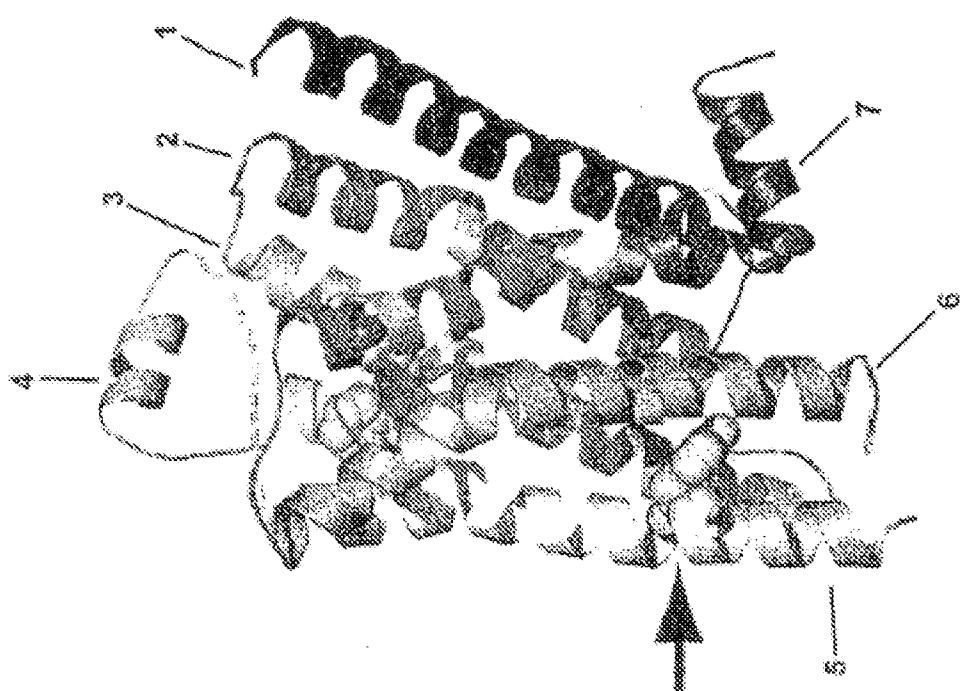
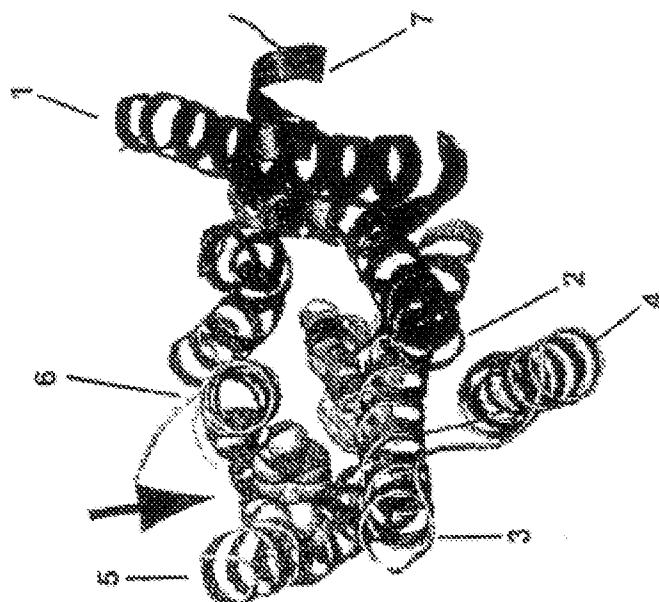


Fig. 23



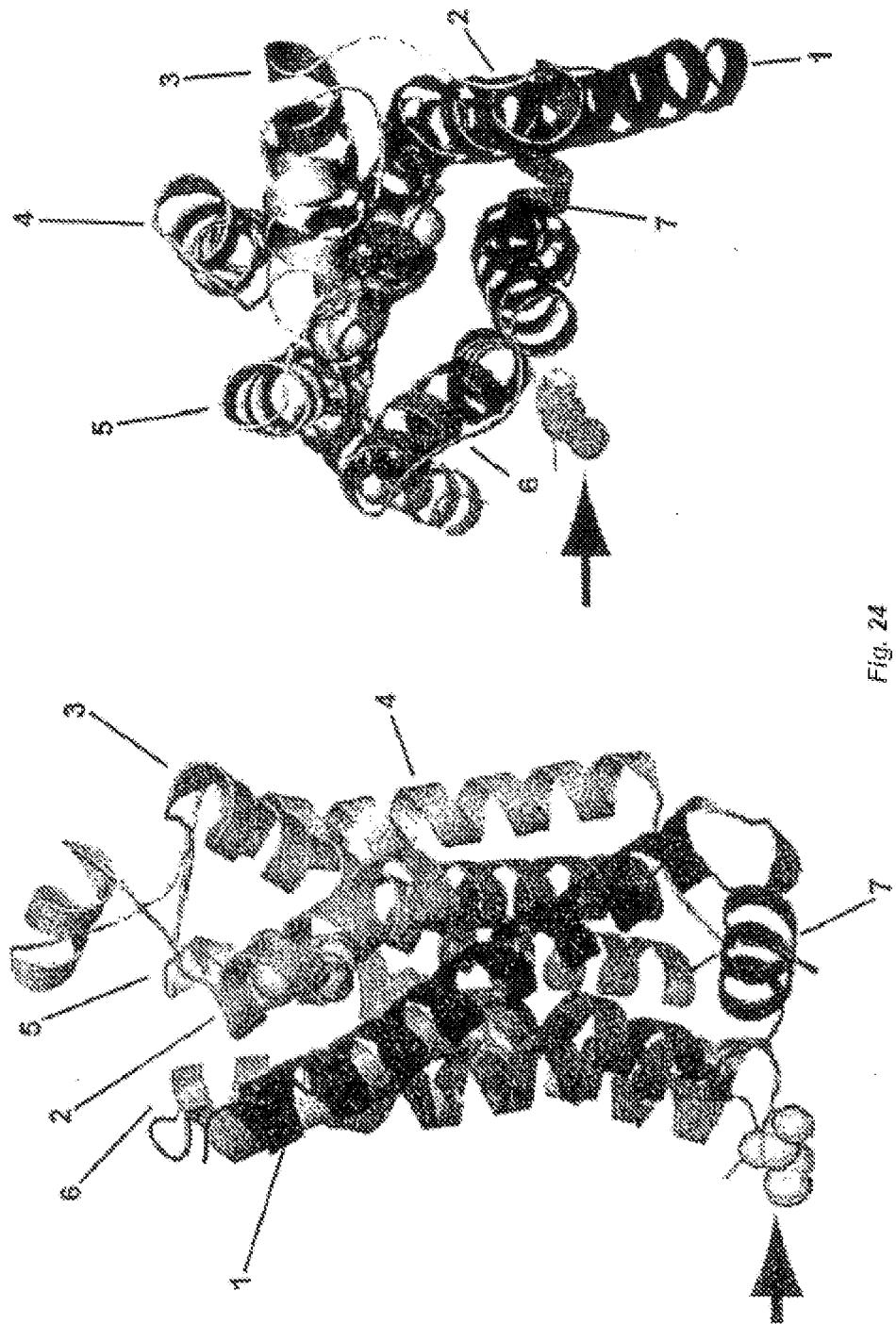


Fig. 24

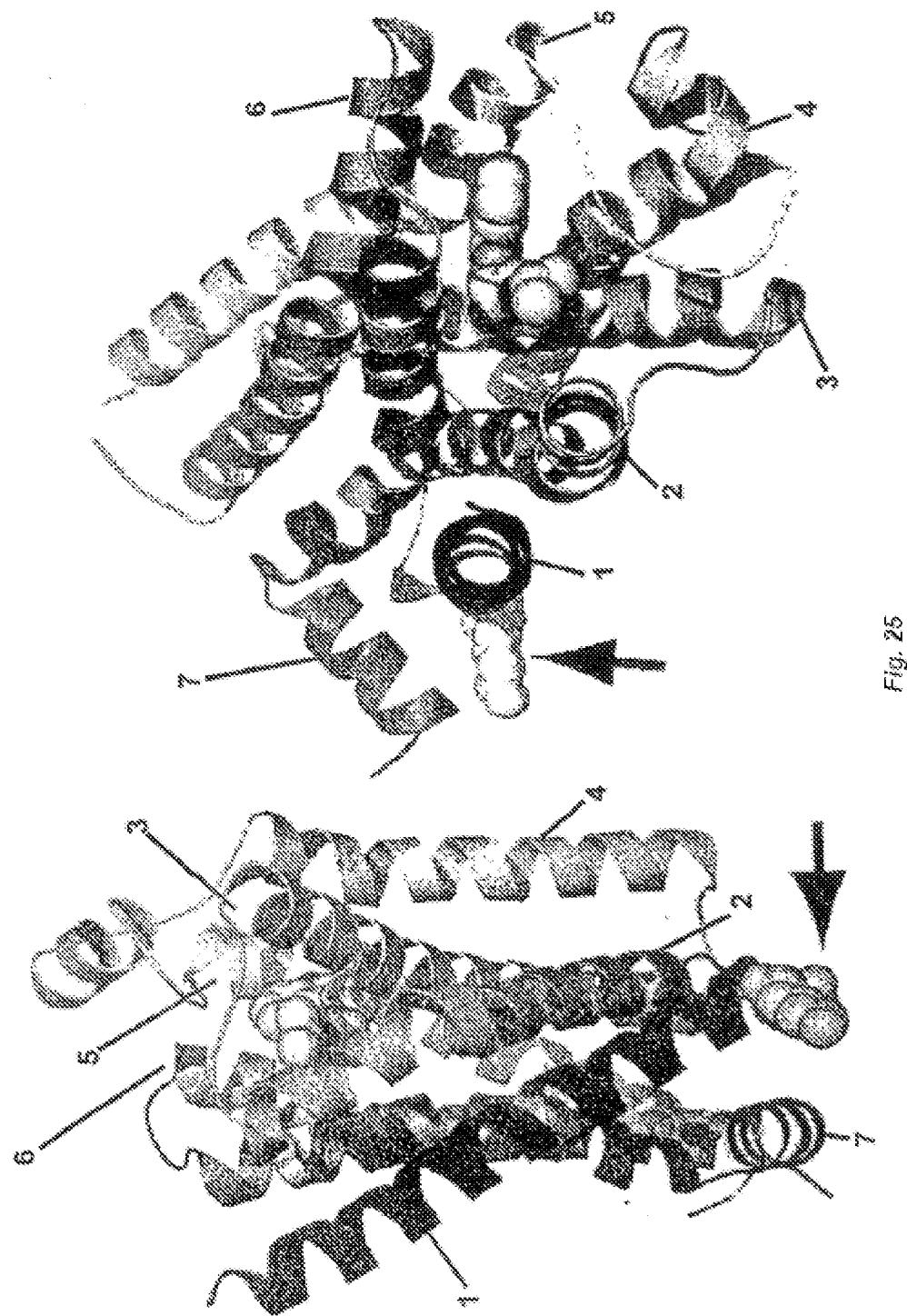


Fig. 25

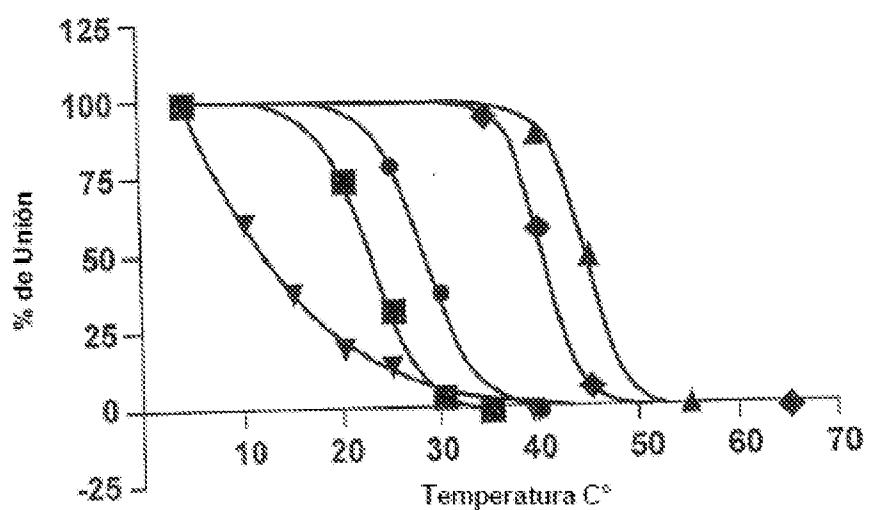


Fig. 26

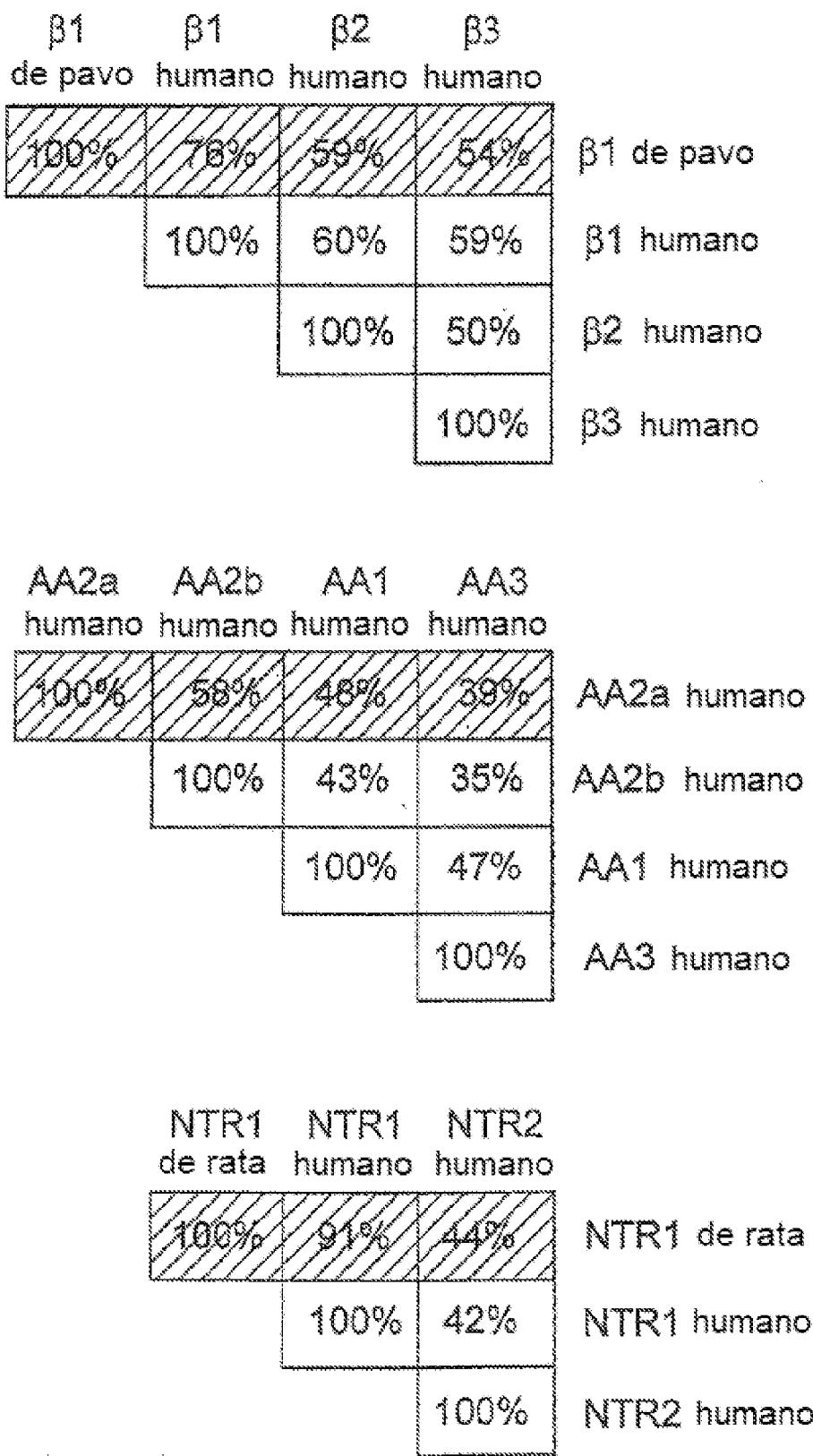


Fig. 27

Fig. 28 (Página 1 de 2)

Alineación de los receptores de neurotransmisores

NTR1_rata	1	MHNSSVPOGTPSEEPDAOPESPOSEMATEFLALSLNSGSNTSSESDTAG	50
NTR1_humano	1	MHNSSAP-GTPGTAADEFORAAGLEELLAPSGNASCNAASERVILAA	49
NTR2_humano	1	METSEP--RPPRESSNG-----L-S	18
	*	*	*
NTR1_rata	51	PSNSDLDVNTDYSKVLVLTGKLYLVEVGVYVNSVTEFLARKKSLOSSKE	100
NTR1_humano	50	PSSELDVNTDYSKVLVLTAVIALTVCTGVTGHTVPAFTLARKKSLOSS	99
NTR2_humano	19	LDAEFLGVDTTAKVLTATVALVALNALGAAGNALSVHNVVKAR--AGCAG	66
	*	*	*
NTR1_rata	101	TWVYVULSCLLIVLQIIMPEVELYNNITINWHSHWAPEGAGCGYVYELBO	150
NTR1_humano	100	TVVYHNGSIALSODHITPLAAMPVELYNNITINWHSHWAPEGAGCGYVYELD	149
NTR2_humano	67	BLRHIVLSSLIAAGLLVLLVYSPWNEHYPPWNGDLGCRCGYVYEHRE	116
	*	*	*
NTR1_rata	151	ACTYXSPAINVASLSEVERVILATCHPEPEKTTKMSRSRTKKFISAIWASALI	200
NTR1_humano	150	ACTYXAAINVASLSEVERVILATCHPEKAKTLMRSRSRTKKFISAIWASALI	199
NTR2_humano	117	ICAAYATVLSVAGCISAERCLAVCOPLRGSLITPRTRWLVALSWAASLGL	166
	*	*	*
NTR1_rata	201	AIEPKEFQGLONR--SGps-TIPGCLVCTPIGOTATVKVIVQWNTMSEI	247
NTR1_humano	200	AVEMLETCGEONR--SADS-QWACGLVCTPIGOTATVKVIVQWNTMSEI	246
NTR2_humano	167	ATENAYVMEQKHEELTAQCEEEPAASRVCTVIVSITALQWVQWNTMSEV	216
	*	*	*



(a) N103: Termoestabilidad obtenida con A, N, S, V, L, M
Solo H103N y H103S proporcionaron niveles de expresión wt

Fig. 28 (Página 2 de 2)

Figura 29

Representación esquemática del proceso típico de aislamiento líder para la identificación de ligantes scFv inhibidores

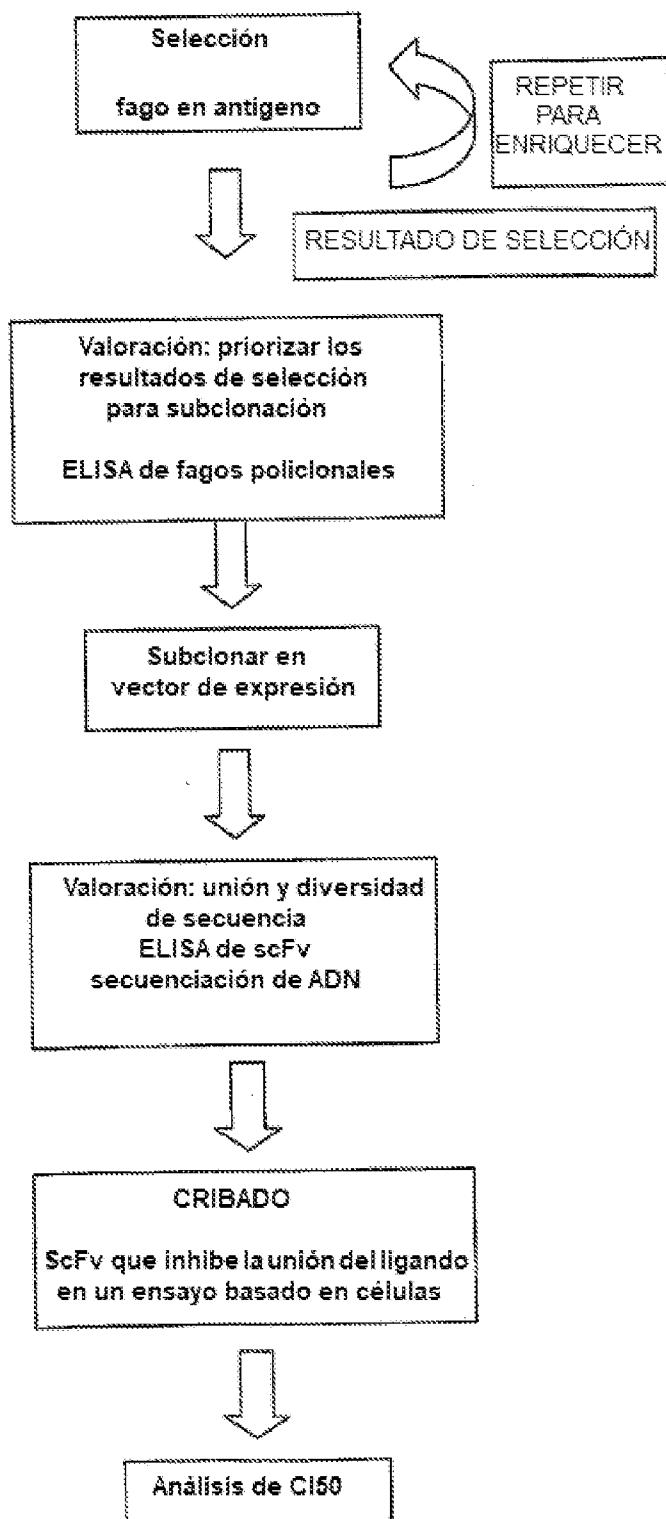
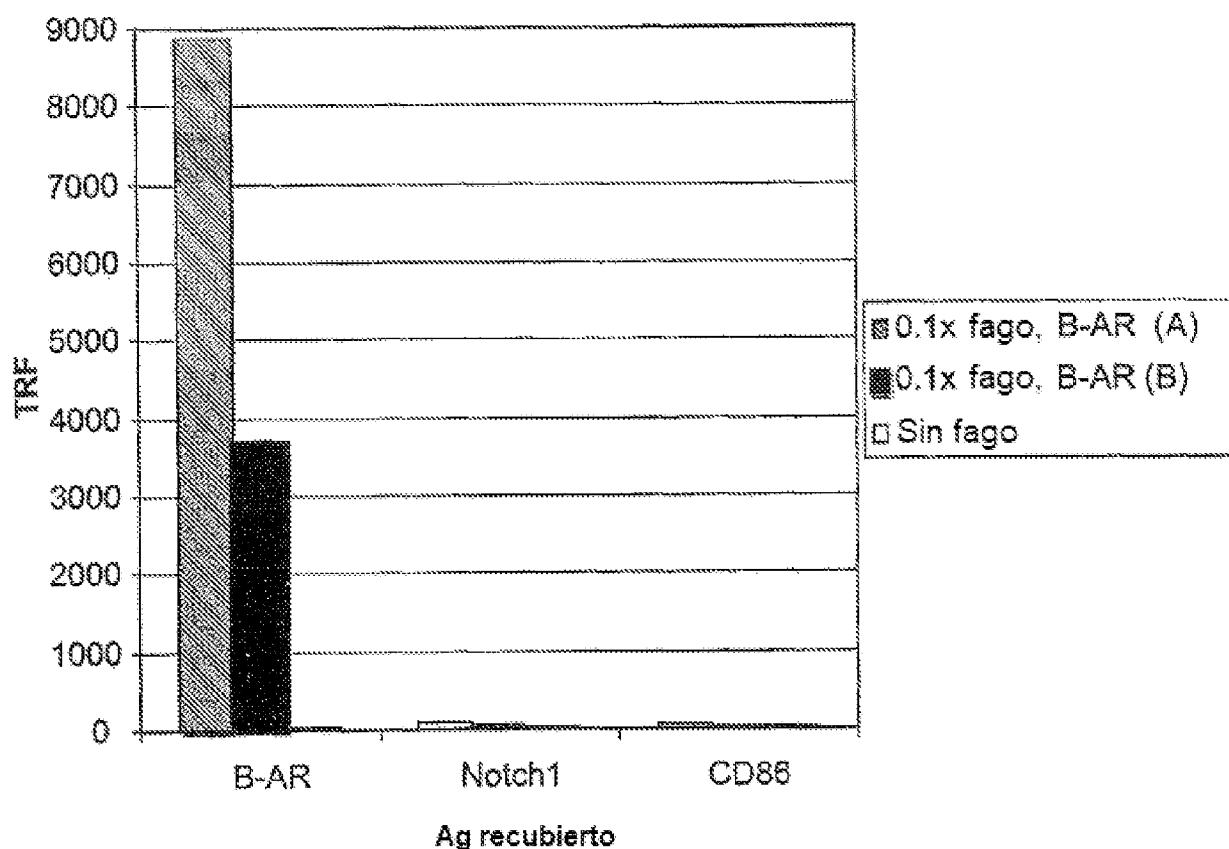


Figura 30 (Página 1 de 2)

A Receptor B-adrenérgico, ELISA policial



ELISA de fagos monoclonales

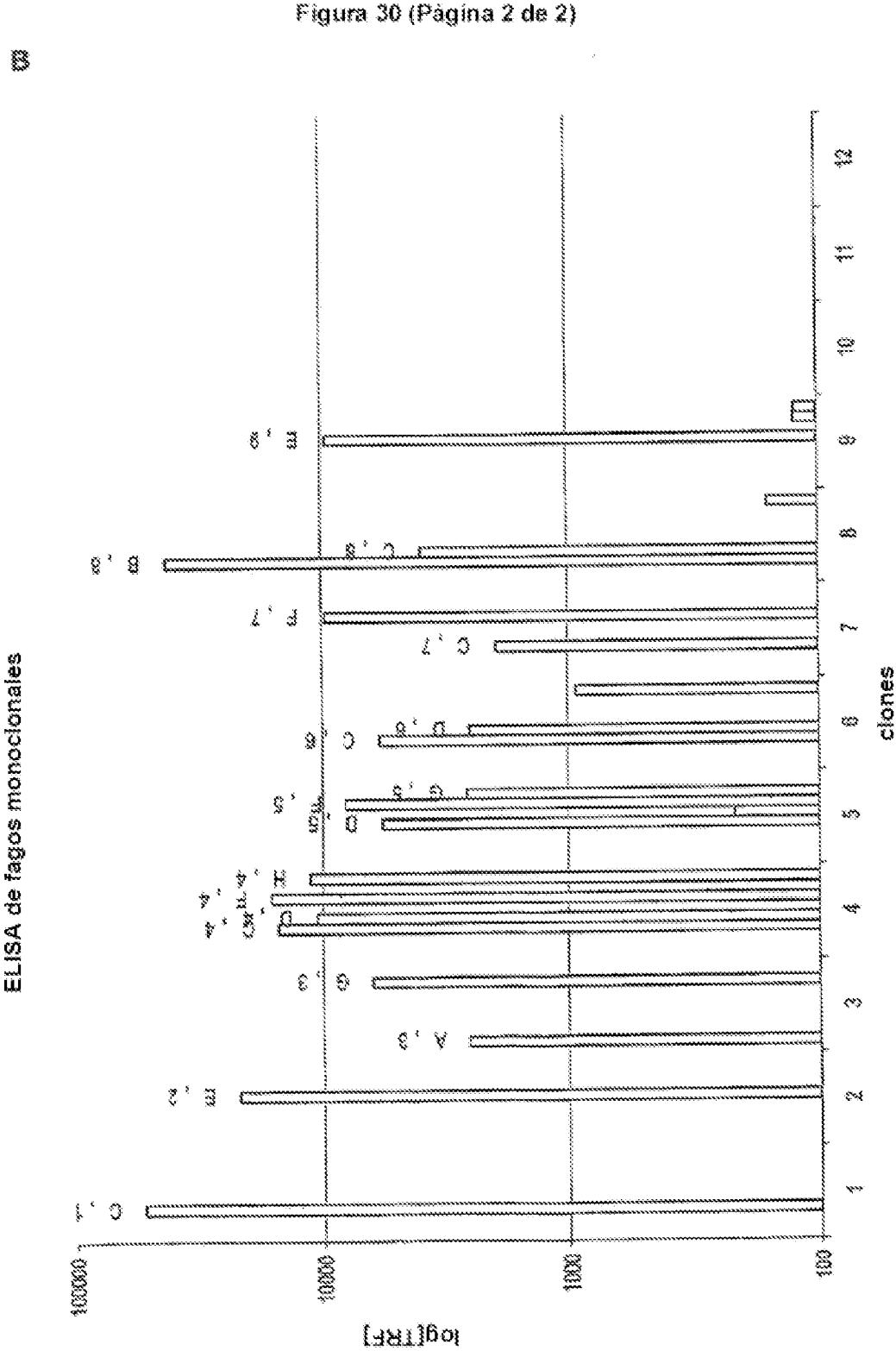
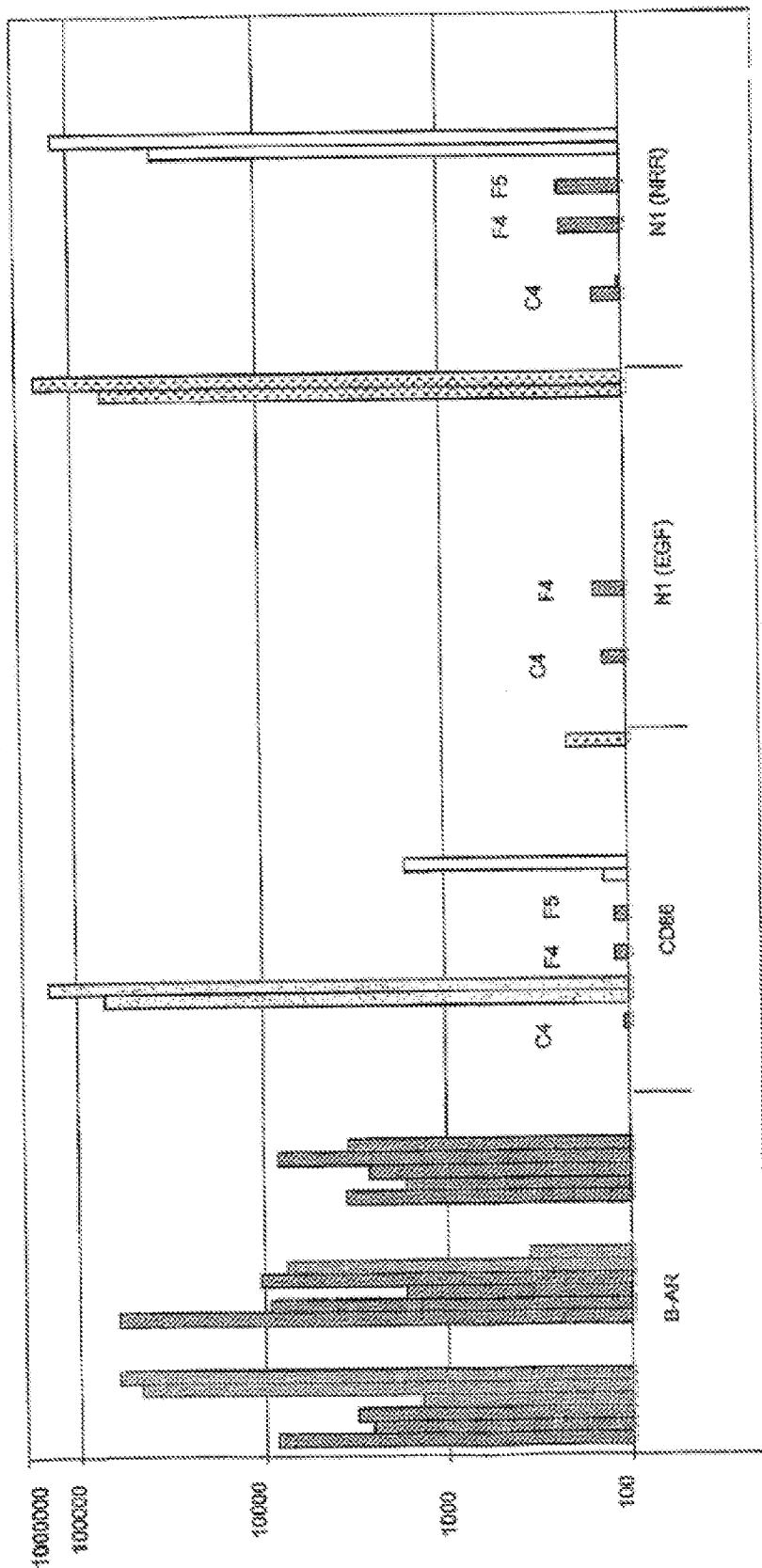


Figura 31 (Pàgina 1 de 2)
26/9/8 B-AR mono fago (placa amino)

A



B

Figura 31 (Página 2 de 2)
26/9/8 B-AR ELISA de mono fago (placa His)

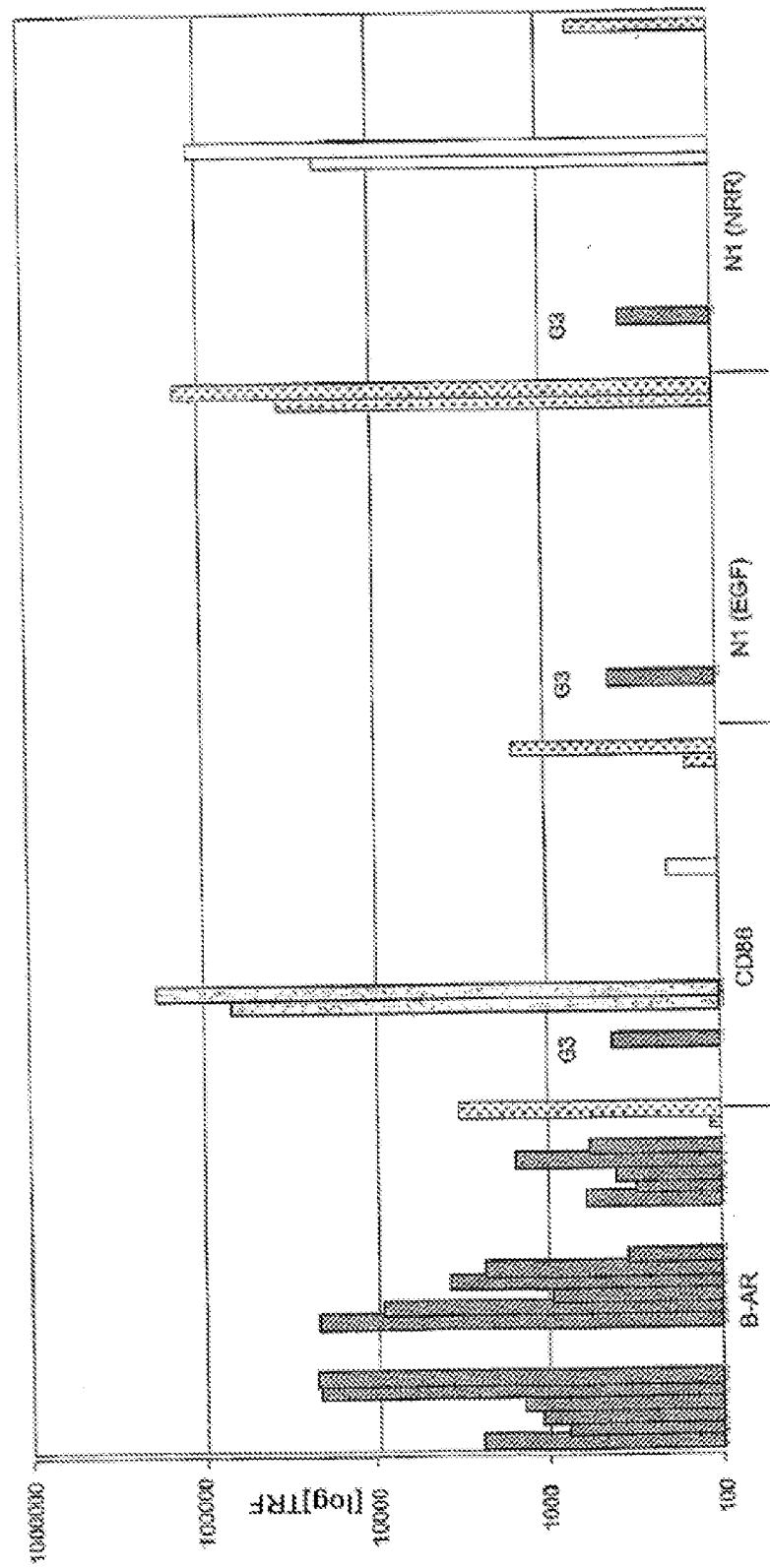


Figura 32

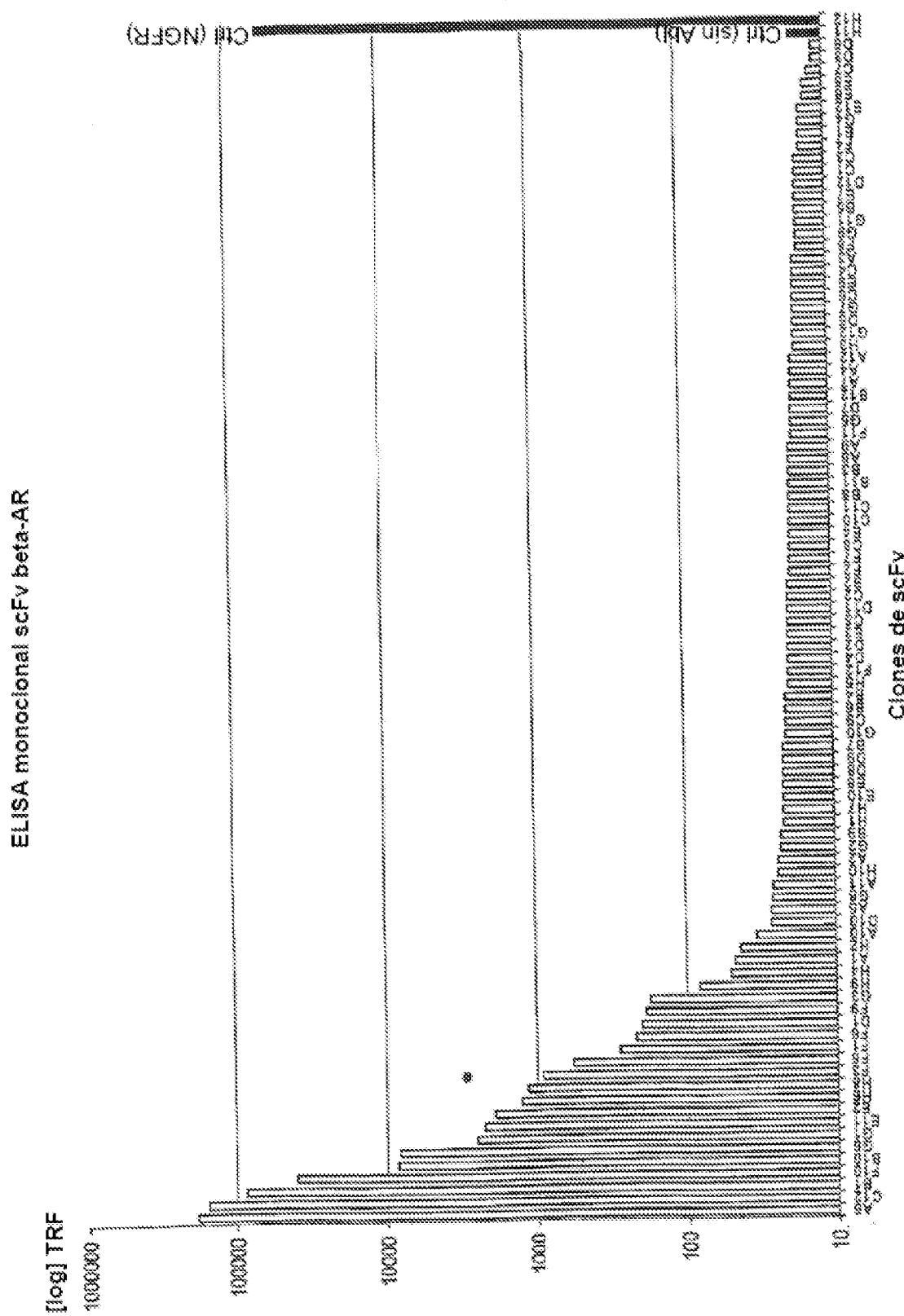
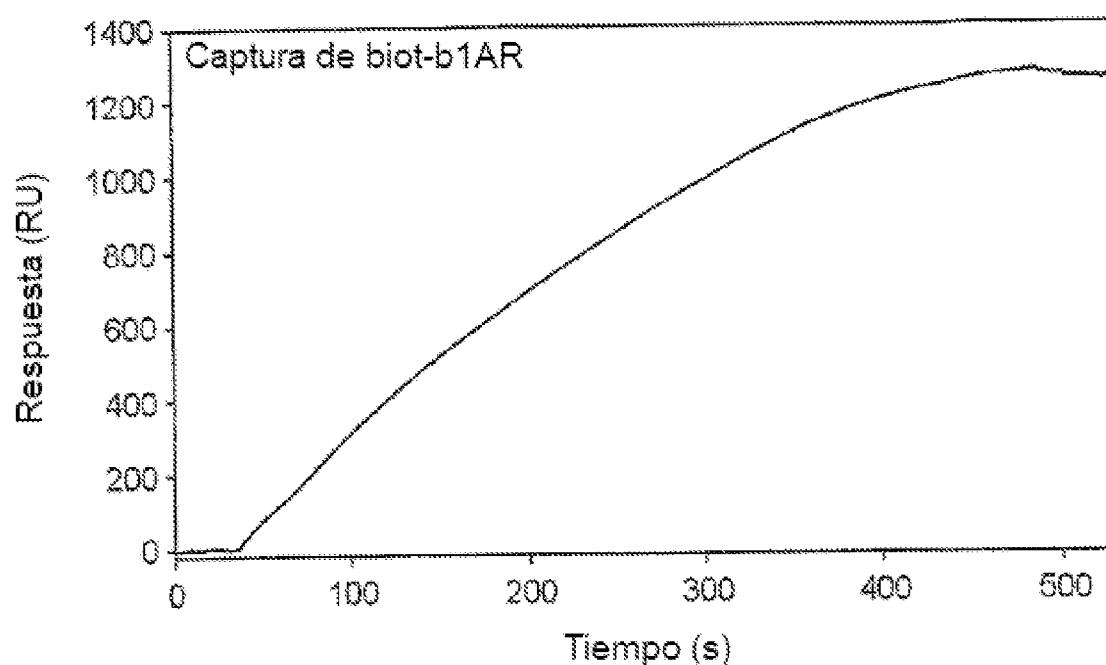


Figura 33

A



B

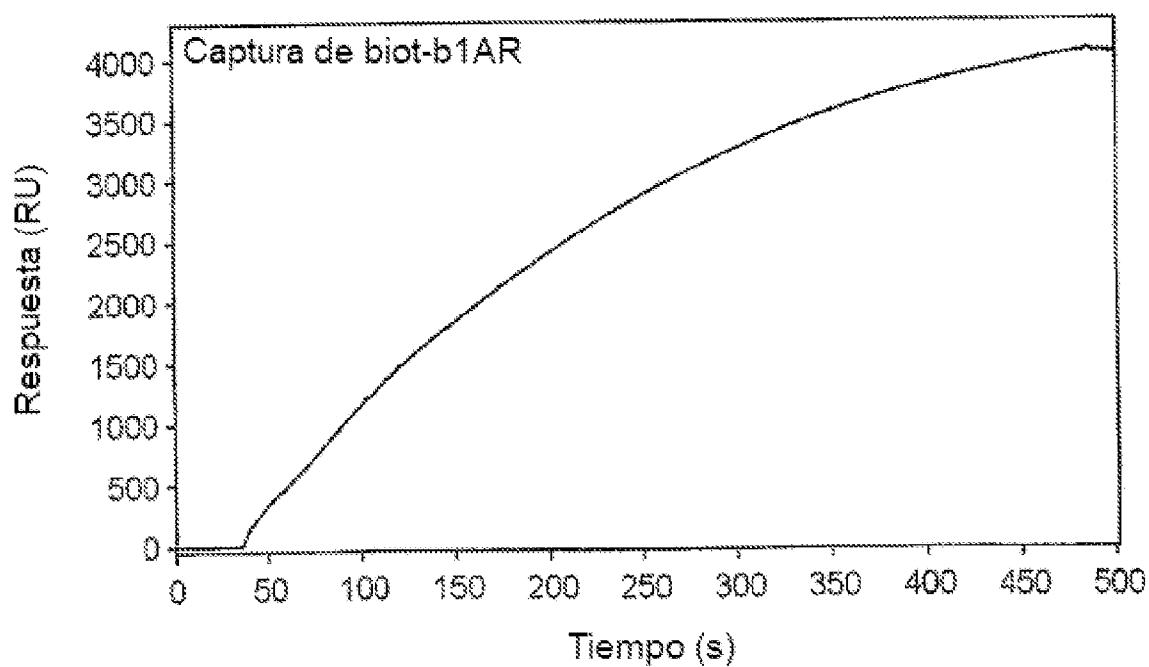


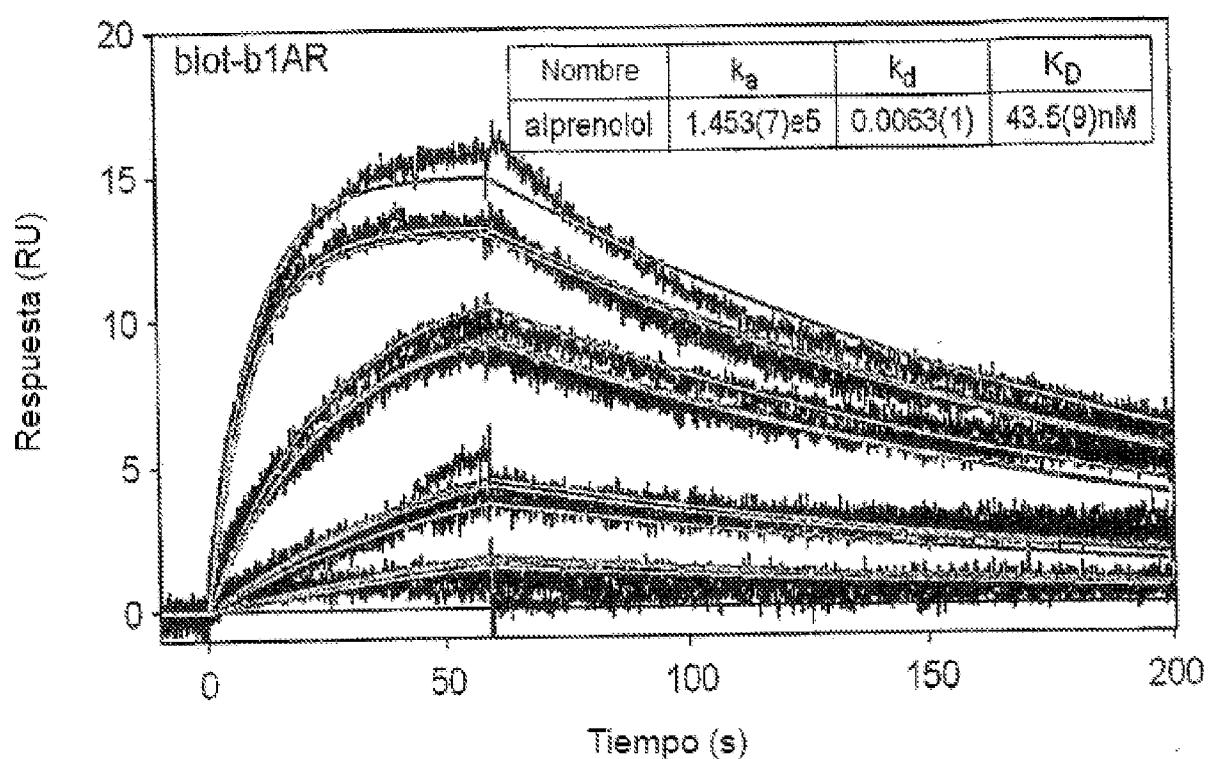
Figura 34

Figura 35

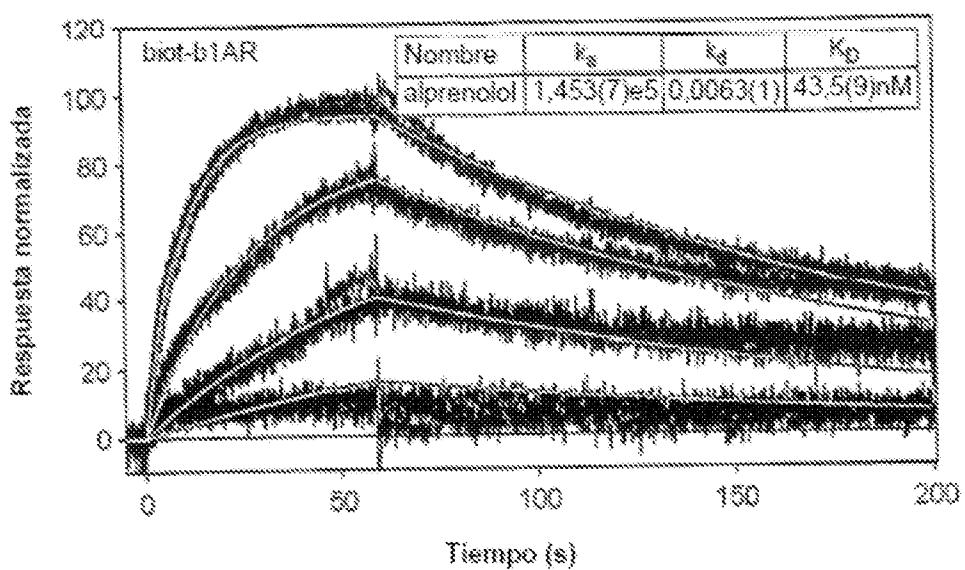


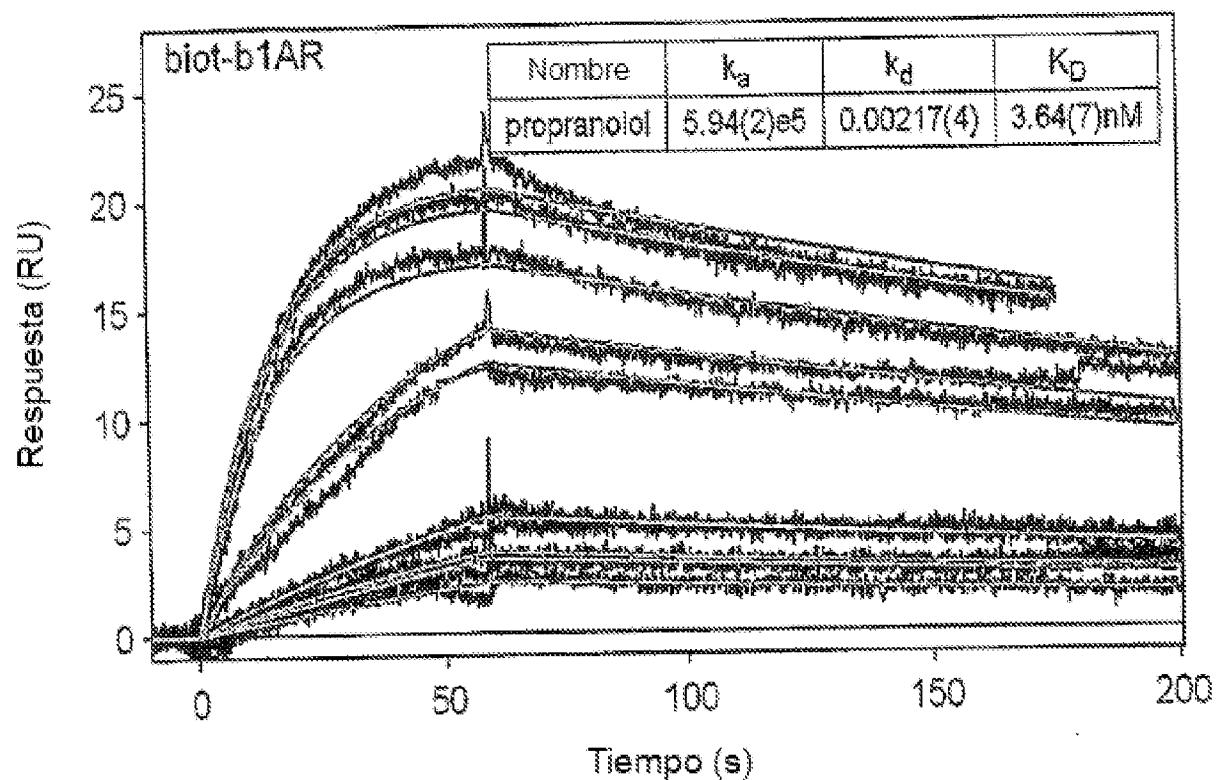
Figura 36

Figura 37

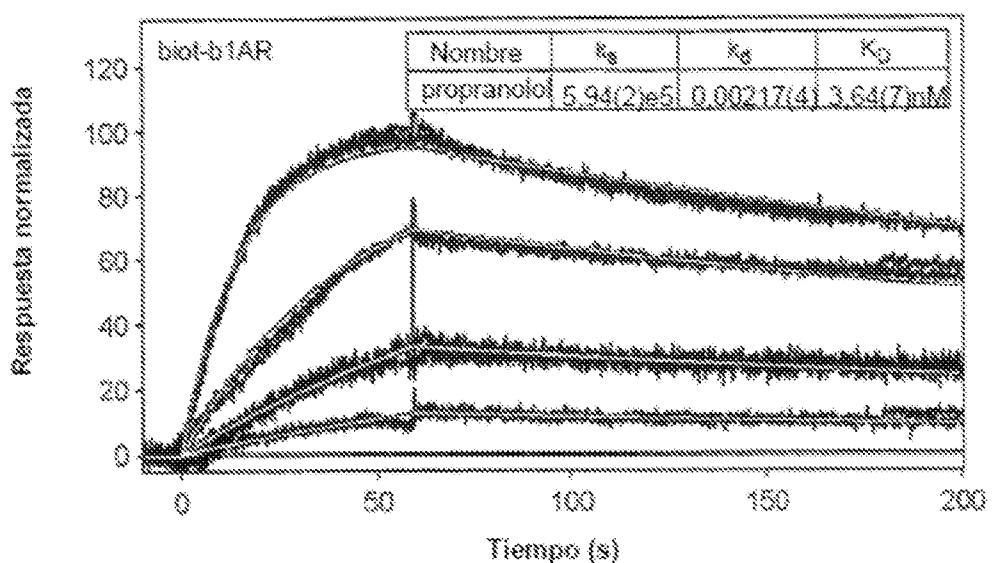


Figura 38

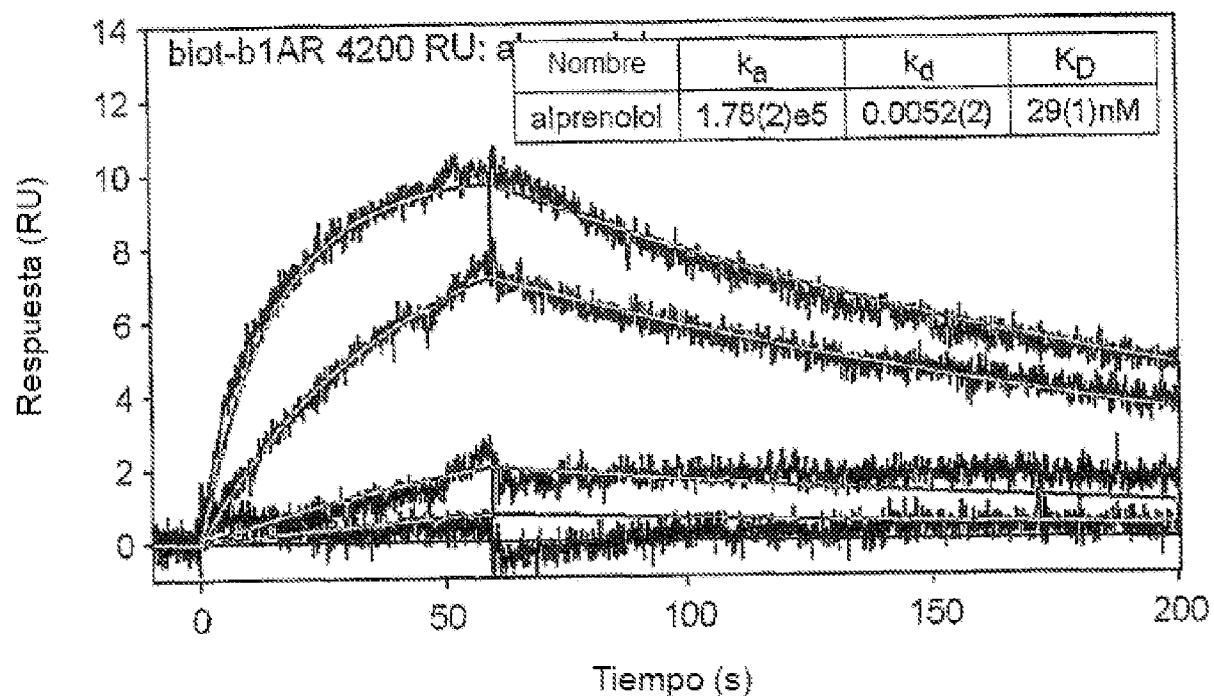


Figura 39

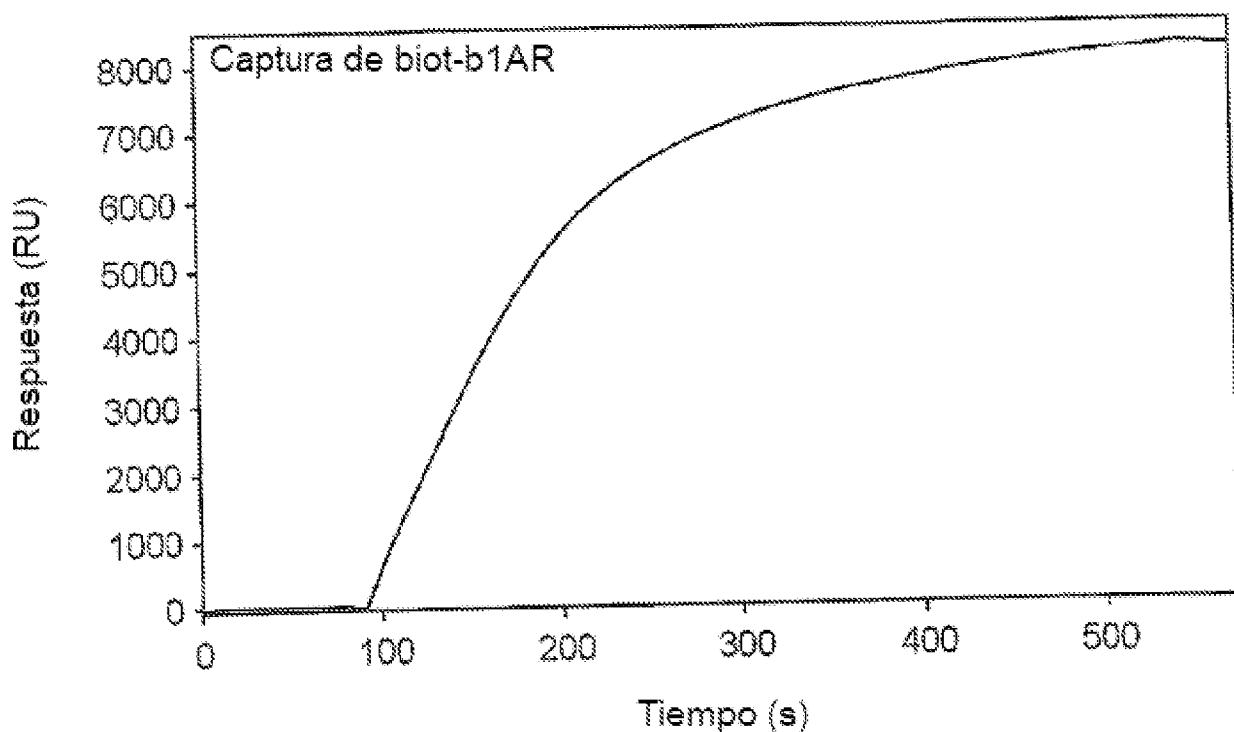


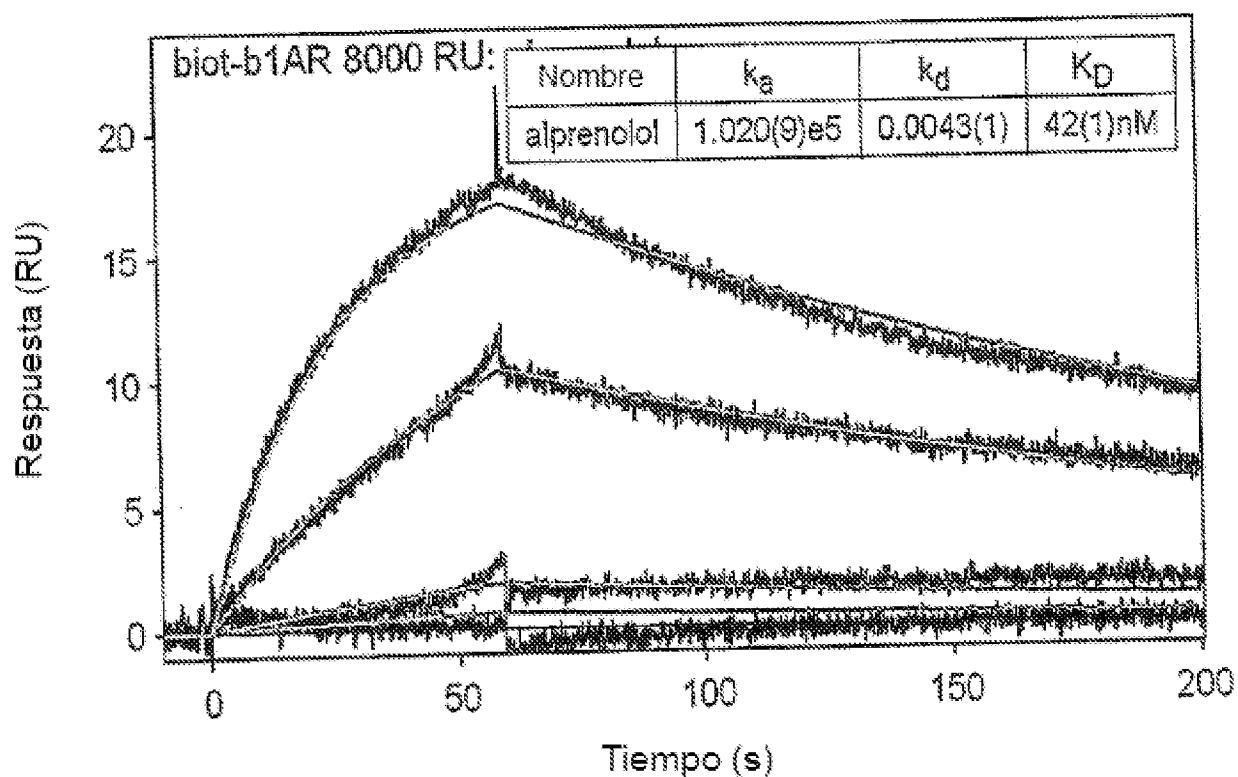
Figura 40

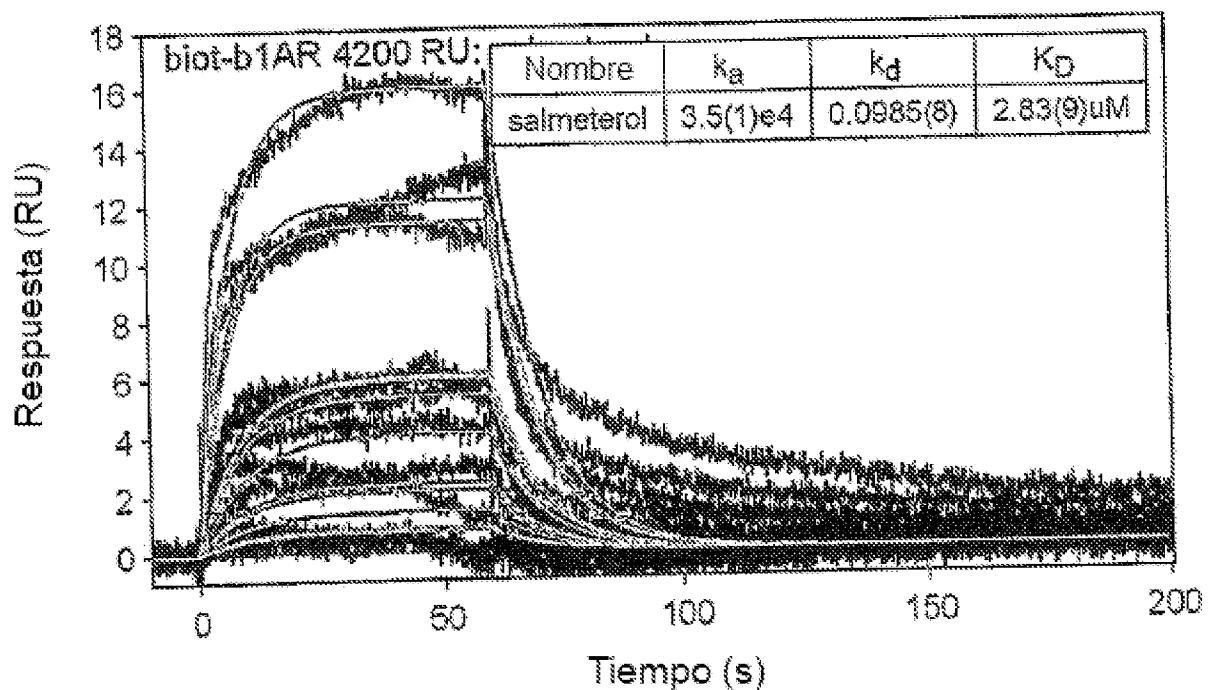
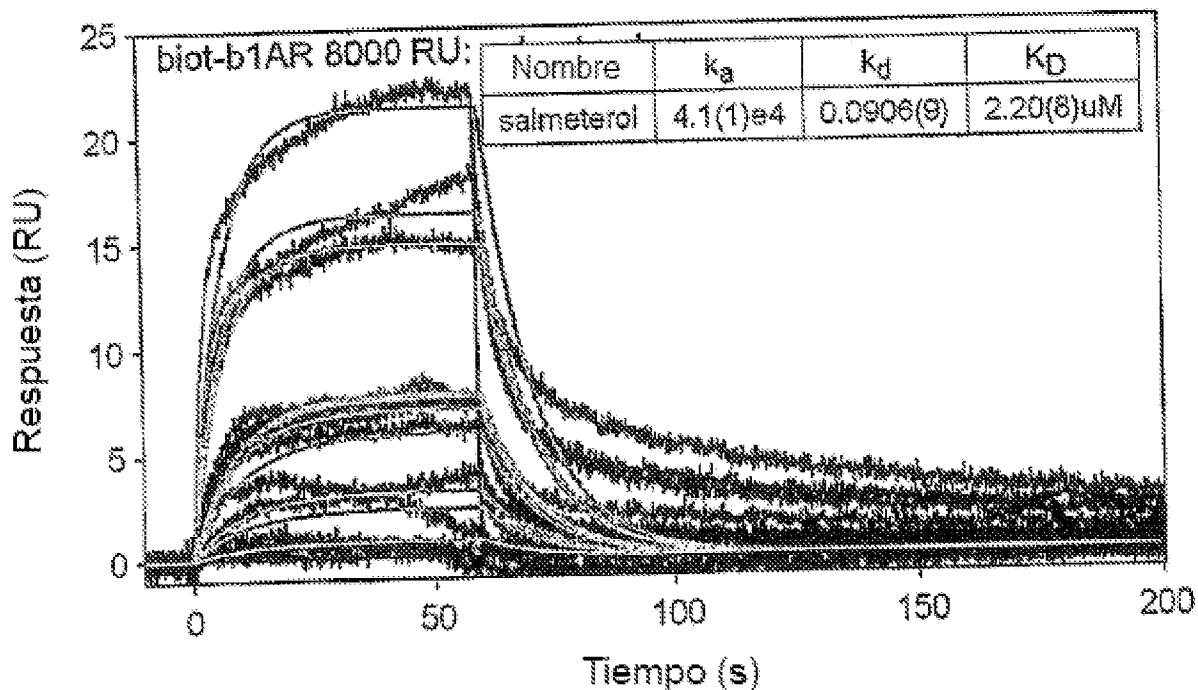
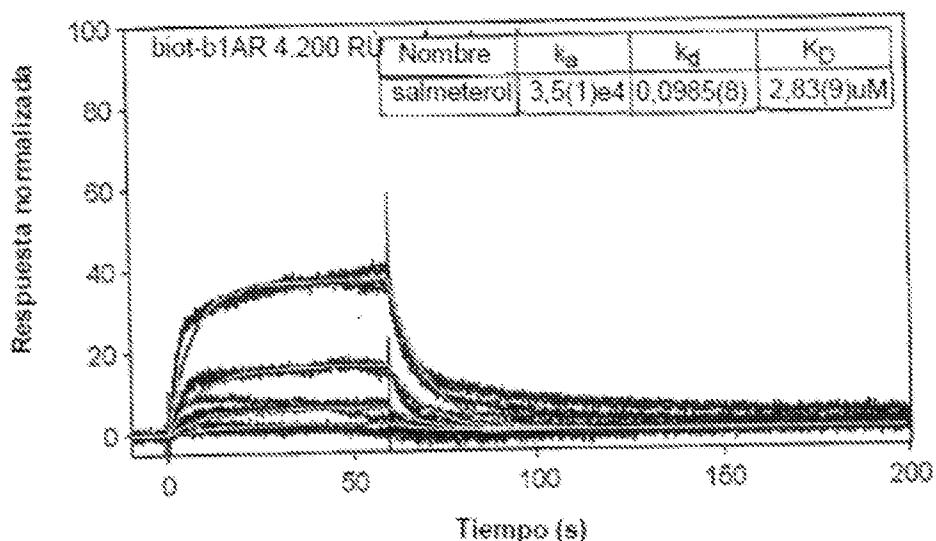
Figura 41**A****B**

Figura 42

A



B

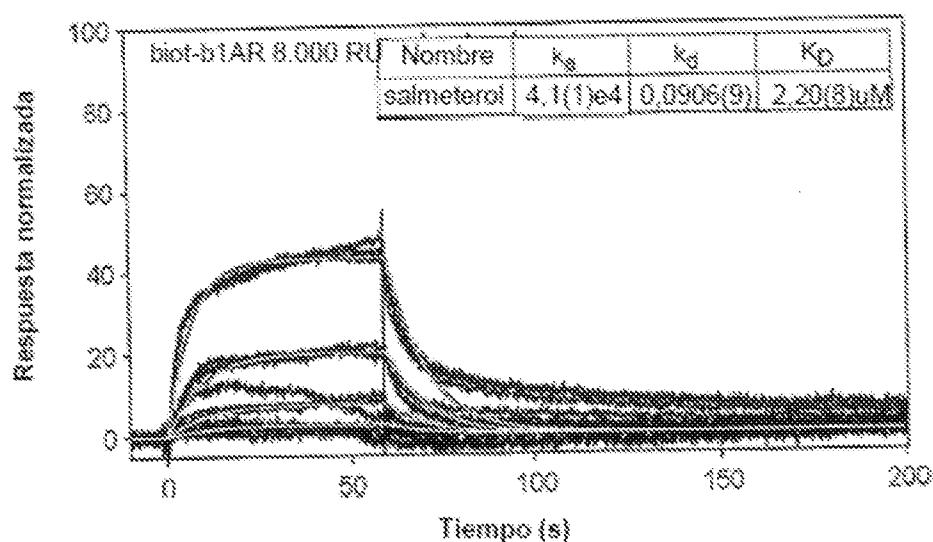


Figura 43

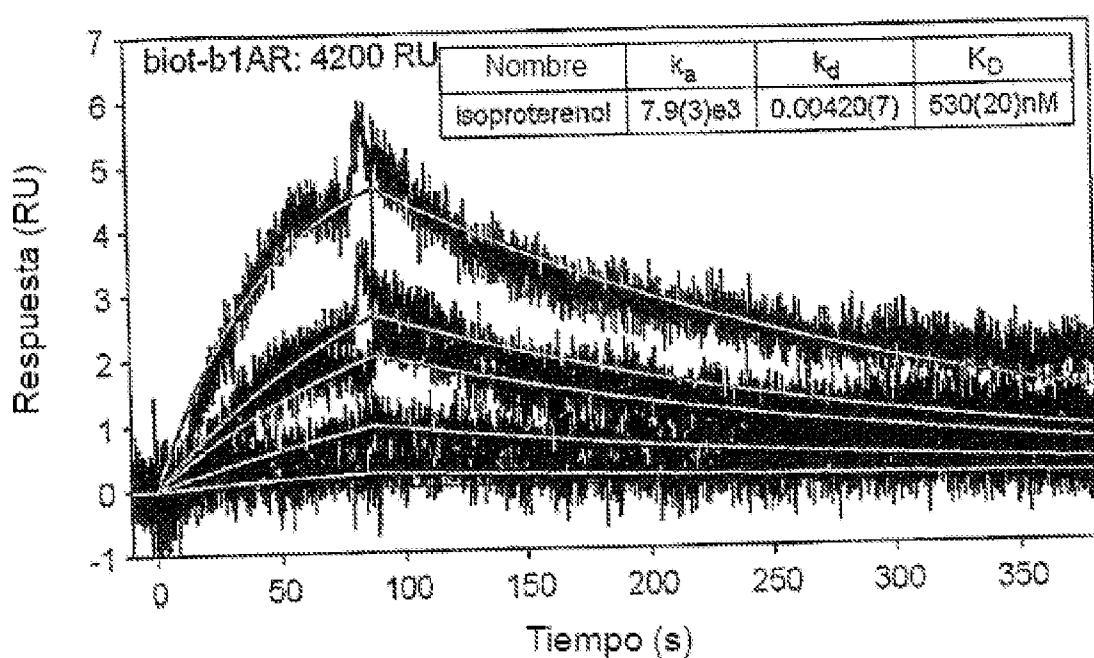
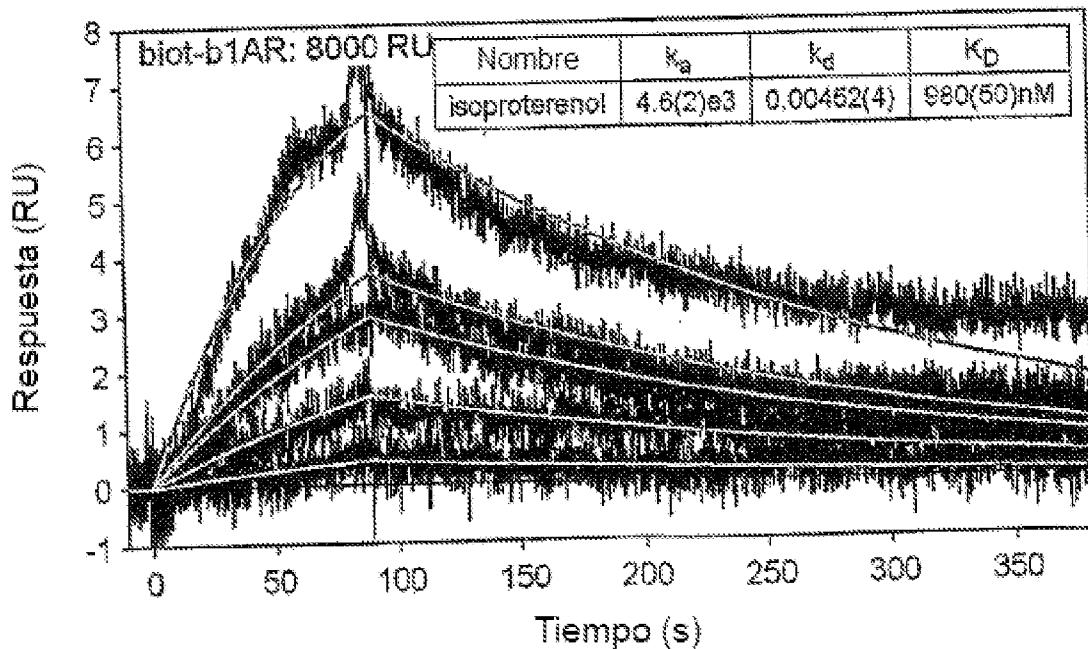
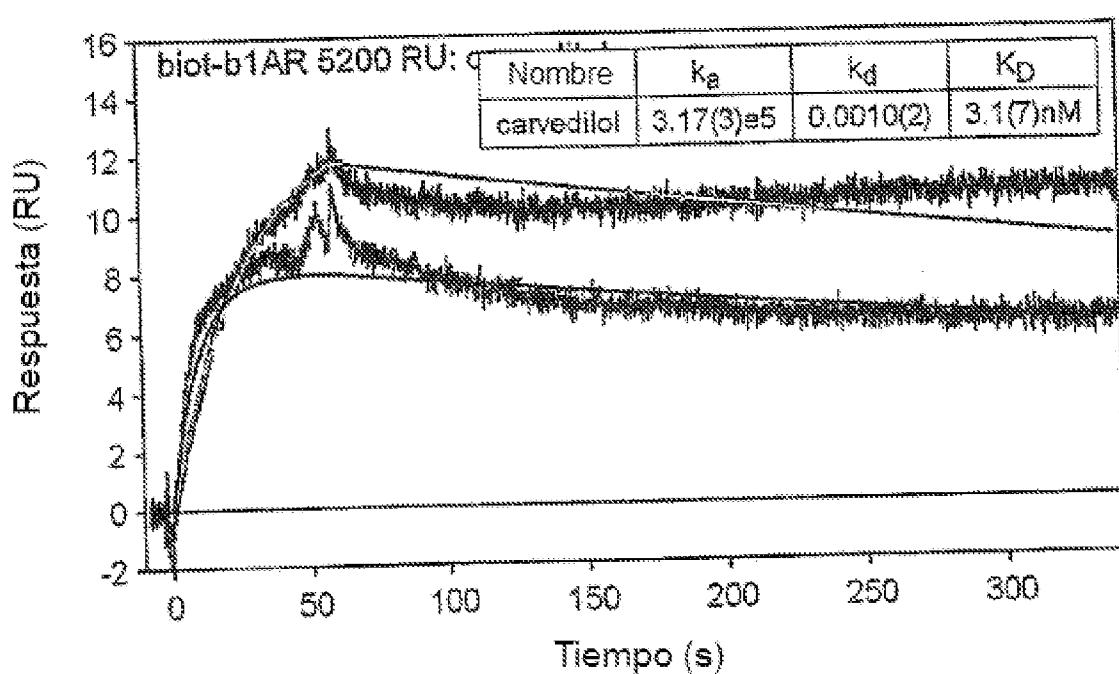
A**B**

Figura 44

A



B

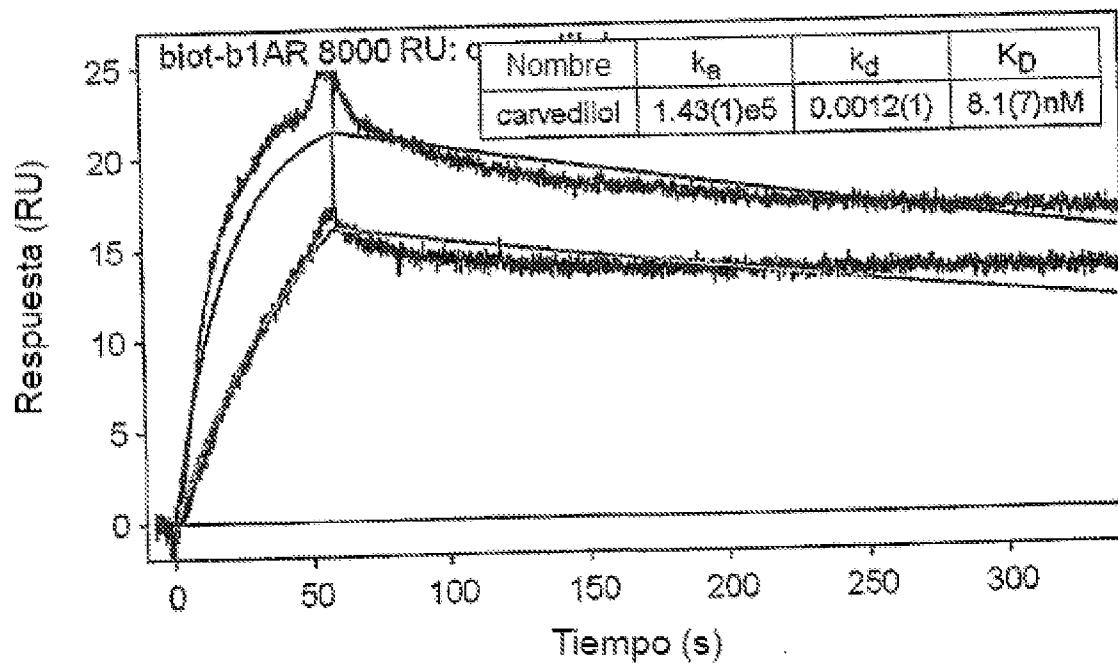


Figura 45

Cribado de prueba Rant 22 HTL0245-HTL0252 17/11/08

