



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 299 242**

51 Int. Cl.:
C07K 14/715 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **99908589 .7**
86 Fecha de presentación : **26.02.1999**
87 Número de publicación de la solicitud: **1056778**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.12.2000**

54 Título: **Antagonistas de los receptores copulados a proteína G.**

30 Prioridad: **27.02.1998 US 76105 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

73 Titular/es: **The Government of the United States of America as represented by The Secretary of the Department of Health and Human Services National Institutes of Health Office of Technology Transfer Suite 325, 6011 Executive Boulevard Rockville, Maryland 20852-3804, US**

72 Inventor/es: **Tarasova, Nadya I. y Michejda, Christopher, J.**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

Antagonistas de los receptores copulados a proteína G.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con la modulación, especialmente la inhibición, de las actividades biológicas de los receptores copulados a proteína G (GPCR) por exposición de los GPCR a moléculas que interfieren con la correcta organización de los receptores. En particular, la invención se relaciona con péptidos aislados del dominio de transmembrana de los GPCR que inhiben la transducción de señal mediada por GPCR.

Antecedentes de la invención

Muchos fenómenos fisiológicamente importantes están mediados por la unión de proteínas reguladoras de la unión a nucleótidos de guanina (proteínas G) a receptores copulados a proteína G (GPCR). Estos fenómenos incluyen vasodilatación, estimulación o reducción del ritmo cardíaco, broncodilatación, estimulación de las secreciones endocrinas y aumento de la peristalsis intestinal, desarrollo, mitogénesis, proliferación celular y oncogénesis.

Las proteínas G son una superfamilia diversa de proteínas que se unen a nucleótidos de guanina y que tienen un papel central en la transducción de señal y en la regulación del metabolismo celular. Están generalmente constituidas por tres subunidades: una subunidad alfa que se une a guanil-nucleótidos, una subunidad beta y una subunidad gamma. (Para una revisión, véase Conklin y col., Cell 73, 631-641, (1993)). Las proteínas G cambian comúnmente entre dos formas, dependiendo de si se une GDP o GTP a la subunidad alfa. Cuando se une GDP, la proteína G existe como un heterotrímero, el complejo alfa-beta-gamma G. Cuando un complejo alfa-beta-gamma se asocia operativamente con un GPCR activado por ligando en una membrana celular, la velocidad de intercambio de GTP por GDP unido aumenta y la subunidad alfa G se disocia del complejo beta-gamma G. La subunidad alfa G libre y el complejo beta-gamma G son capaces de transmitir una señal a elementos secuencia abajo de una variedad de rutas de transducción de señal, por ejemplo por unión a, y activación de, la adenil-ciclasa. Este esquema fundamental de fenómenos forma la base para una multiplicidad de diferentes fenómenos de señalización celular.

Recientes estudios han sugerido que todos los miembros de la superfamilia GPCR tienen una estructura conservada. Comparaciones de los ADNc de receptores beta-adrenérgicos aviares y de mamíferos (Yarden y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 6795-6799, 1986; Dixon y col., Nature 321:75-79, 1986; y Kobilka y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:46-50, 1987), un ADNc de rodopsina bovina (Nathans y Hogness, Cell 34:807-814, 1983), un receptor alfa-2-adrenérgico (Kobilka y col., Science 238:650-656, 1987), un ADNc de receptor de angiotensina (Young y col., Cell 45:711-719, 1986; Jackson y col., Nature 335:437-439, 1988), un receptor de sustancia K bovino (Masu y col., Nature 329:836-838, 1987) y un ADNc de receptor de acetilcolina muscarínico (Kubo y col., Nature 323:411-416, 1986) predicen que todos los GPCR comparten una presencia altamente conservada de siete dominios de transmembrana hidrofóbicos que se sugiere son hélices de transmembrana de 20-30 aminoácidos conectadas por bucles extracelulares o citoplásmicos. Kobilka y col., Science 240: 1310 (1988); Maggio y col., FEBS Lett. 319: 195 (1993); Maggio y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3103 (1993); Ridge y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3204 (1995); Schonenberg y col., J. Biol. Chem. 270: 18000 (1995); Huang y col., J. Biol. Chem. 256: 3802 (1981); Popot y col., J. Mol. Biol. 198: 655 (1987); Kahn y Engelman, Biochemistry 31: 6144 (1992); Schoneberg y col., EMBO J. 15: 1283 (1996); Wong y col., J. Biol. Chem. 265: 6219 (1990); Monnot y col., J. Biol. Chem. 271: 1507 (1996); Gudermann y col., Annu. Rev. Neurosci. 20: 399 (1997); Osuga y col., J. Biol. Chem. 272: 25006 (1997); Lefkowitz y col., J. Biol. Chem. 263:4993-4996, 1988; Panayotou y Waterfield, Curr. Opin. Cell Biol. 1:167-176, 1989. Estos dominios de transmembrana de receptores copulados a proteína G designados como TM1, TM2, TM3, TM4, TMS, TM6 y TM7, TM4, TM5, TM6 y TM7 son los más altamente conservados y se postula que proporcionan secuencias que imparten actividad biológica a los GPCR. TM3 está también implicado en la transducción de señal.

Se dice que la copulación de GPCR a moléculas de señalización intracelular tales como la adenilato ciclasa (Anand-Srivastava y col., J. Biol. Chem. 271: 19324-19329 (1996)) y las proteínas G (Merkouris y col., Mol. Pharmacol. 50: 985-993 (1996)) está inhibida por péptidos correspondientes a los bucles intracelulares de los receptores. Esos estudios fueron realizados primariamente para obtener una comprensión de los mecanismos moleculares de la función de los receptores y no podrían ser directamente aplicados al diseño de fármacos, por las dificultades en la administración intracelular de los inhibidores.

WO 94/05695 y la Patente EE.UU. N° 5.508.384 exponen secuencias de regiones de transmembrana para 74 GPCR. La publicación de patente WO 94/05695 describe y reivindica polipéptidos correspondientes a fragmentos o secuencias homólogas de GPCR que pueden unirse a un ligando GPCR o que pueden modular la unión de ligando. Ambas referencias describen que un fragmento que se expande por la membrana del tercer dominio TM del receptor de dopamina D2 se unía específicamente a un ligando del receptor intacto en un modelo de pequeñas vesículas unilamelares simples. El fragmento usado acababa en una lisina (que está positivamente cargada a pH fisiológico) en un extremo y en un ácido aspártico (que está negativamente cargado a pH fisiológico) en el otro. No se esperaba que este péptido se insertara fácilmente en una membrana biológica.

Resumen de la invención

La invención comprende, en general, compuestos peptídicos o peptidomiméticos que modulan, y preferiblemente inhiben, las propiedades y actividades biológicas de los GPCR abordando porciones de transmembrana de estos receptores. Los antagonistas de GPCR pueden ser usados para alterar la función de los GPCR.

Se describe aquí el uso de tecnología de ADN química o recombinante para obtener polipéptidos GPCR, que preferiblemente son lo más pequeños posible conservando a pesar de ello una afinidad suficientemente alta para unirse o asociarse a GPCR. Como ejemplos no limitativos de polipéptidos GPCR, se incluyen fragmentos de 10 a 50 aminoácidos correspondientes a al menos un dominio de transmembrana de los dominios 1-7. Los siguientes son ejemplos no limitativos de péptidos GPCR con propiedades antagonistas.

Del GPCR CXCR4

F-2-2: LLFVITLPFWAVDAVANWYFGNDD

F-2-5: LLFVITLPFWAVDAVANDD-OH

F-4-2: VYVGWIPALLLTIPDFIFANDD-OH

F-6-1: VILILAFFACWLPYYIGISID-OH

F-7-3: DDEALAFFHCCLNPILYAFL-NH₂

F-7-4: DDSITEALAFFHCCLNPILYAFL-NH₂

Del GPCR CCR5

CCR5-TM-2-2: LFFL LTVPFWAHYAAAQWDFGDD

CCRS-TM-4-1: FGVVTSVITWWAVFASLPGIIFTSSDD

CCRS-TM-6-1: LIFTIMIVYFLFWAPYNIVLLLNTFQED

Del GPCR CCR2

CCR2-TM-2-1: IYLLNLAISDLLFLITLPLWADD-OH

CCR2-TM-2-2: LLFLITLPLWAH SAANEWVFGNDD-OH

CCR2-TM-4-1: FGVVTSVITWLVAVF ASVPGIIFTDD

CCR2-TM-6-1: VIFTIMIVYFLFWTPYN IVILLNTFQED

Del GPCR CCR3

CCR3-TM-2-1: LLFLVTLFPW IHYVRGHNWVFGDDDD

CCR3-TM-4-1: FGVITSIVTWGLAVLAALPEFI FYETED

CCR3-TM-6-1: IFVIMAVFFI FWTPYNVAILLSSYQSDD

Del GPCR CCKAR

CCKAR-TN-2-1: FLLSLAVSDLMLCLFCMPFNLP

CCKAR-TM-2-2: FLLSLAVSDLMLCLFCM PFNLIDD

CCKAR-TM-6-4: IVVLFFLCWMPIFSANAWRAYDTVDD

Una realización de la invención es una molécula moduladora del receptor copulado a proteína G (GPCR) aislada que tiene un péptido o peptidomimético de 5 a 50 aminoácidos que es un análogo estructural de una porción de un dominio de transmembrana de un GPCR, donde dicha molécula tiene un extremo N y un extremo C y dicha molécula tiene un extremo extracelular que está negativamente cargado y un extremo intracelular que tiene una carga neutra en condiciones fisiológicas, y donde dicha molécula tiene un grupo carboxilo C-terminal amidado cuando dicho extremo N tiene una carga neutra, y, cuando dicho extremo intracelular es dicho extremo N, dicho péptido o peptidomimético incluye al menos cuatro de los primeros cinco aminoácidos N-terminales que tienen cadenas laterales de aminoácidos de carga neutra en condiciones fisiológicas; dicha molécula se inserta espontáneamente en una membrana en la mis-

ma orientación que el dominio GPCR de transmembrana del que deriva; y dicha molécula modula una propiedad o actividad biológica de dicho GPCR alterando la estructura u organización de dicho GPCR.

En una realización particular, las moléculas contienen un grupo de cabeza no peptídico hidrofílico negativamente cargado y una cola no cargada, que asegura la correcta orientación de la molécula en la membrana celular. En otra realización, el grupo de cabeza negativamente cargado es uno o más aminoácidos ácidos.

Otra realización es una molécula moduladora de GPCR aislada que tiene un péptido o peptidomimético que es un análogo estructural de una porción de un dominio de transmembrana de CXCR4, donde dicha porción de dicho dominio de transmembrana tiene una secuencia seleccionada entre:

LLFVITLPFWAVDAVANWYGND,

LLFVITLPFWAVDAVANDD-OH,

VYVGWIPALLLTIPDFIFANDD-OH,

VILILAFFACWLPPYYIGISID-OH,

DDEALAFFHCCLNPILYAFL-NH₂ y

DDSITEALAFFHCCLNPIL Y AFL-NH₂,

y donde dicha molécula modula una actividad biológica de dicho CXCR4. La actividad CXCR4 modulada por dicho péptido incluye la inhibición de la liberación de Ca²⁺ intracelular mediada por CXCR4 y la inhibición de la infección por VIH mediada por CXCR4.

La invención también incluye las moléculas de la invención para uso en un método terapéutico consistente en modular una actividad biológica de un GPCR de interés por contacto de una célula que expresa dicho GPCR con una molécula de la invención. En un método, el GPCR de interés es CXCR4, CCR5 o CCR2 y la actividad biológica modulada es la inhibición de la infección por VIH mediada por GPCR. En otro método, el GPCR de interés es CXCR4 y la actividad biológica modulada es la inhibición de la liberación de Ca²⁺ intracelular mediada por CXCR4.

Otra realización es el uso de una molécula moduladora de GPCR de la invención para la fabricación de un medicamento para inhibir la infección por VIH-1, donde el contacto de una célula que expresa el GPCR con dicha molécula inhibe la infección por VIH-1. El péptido o peptidomimético puede ser un análogo estructural de una porción de un dominio de transmembrana de CXCR4 o CCR5. El péptido correspondiente a regiones TM o CXCR4, un GPCR que funciona como correceptor durante la entrada en la célula del VIH, fue diseñado y estudiado en células y dio una potente inhibición de la entrada del VIH sin aparente toxicidad para las células.

Se demuestra la utilidad de este uso abordando especialmente el CXCR4 que funciona como correceptor durante la entrada en la célula de cepas trópicas de células T de VIH-1. Los péptidos que contenían 20-25 residuos de aminoácidos inhibían la señalización de receptores y la infección por VIH-1 *in vitro* a concentraciones de tan sólo 0,2 micromolar.

En una realización, las moléculas de la presente invención imitan un dominio de transmembrana del receptor seleccionado y bloquean la autoorganización de ese receptor, posiblemente por inhibición competitiva con el dominio TM nativo. Bloquean o inhiben así la transducción de señal en la célula afectada.

La invención también incluye análogos peptídicos peptidomiméticos que poseen propiedades beneficiosas tales como una mayor vida media, falta de inmunogenicidad y capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica.

Los análogos peptídicos de la invención median en los efectos químicos y/o biológicos de agonistas/antagonistas de hormonas u otros péptidos. Se cree que son útiles para el desarrollo de técnicas farmacéuticas, terapéuticas y diagnósticas. En consecuencia, los análogos son usados en métodos para producir una respuesta profiláctica o terapéutica en un mamífero por administración al mamífero de una cantidad farmacéuticamente efectiva de uno o más análogos peptídicos de la invención. En realizaciones preferidas, se usan los análogos en métodos para producir tales respuestas por modulación de la actividad de al menos un receptor unido a proteína G de mamífero administrando una cantidad efectiva de uno o más análogos peptídicos de la invención.

En otra realización, un péptido de la invención puede modular la actividad biológica de más de un GPCR. En otra realización, se administran más de un péptido de la invención como un cóctel para modular la actividad biológica de más de un GPCR.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Eficacia anti-VIH y toxicidad del ensayo F-2-2. Se infectaron células CEM-SS con la cepa LAV de VIH-1.

Figura 2. Eficacia anti-VIH y toxicidad de F-4-2 en citoprotección. Se infectaron células CEM-SS con la cepa RF de VIH-1, que causa la muerte celular si el inhibidor de la infección no está presente.

Figura 3. El modelo propuesto de acción de los antagonistas de transmembrana.

Definiciones

Una “proteína G” es cualquier miembro de la superfamilia de proteínas de unión a nucleótidos de guanina de transducción de señal.

Un “receptor copulado a proteína G” es cualquier miembro de una superfamilia de receptores que media en la transducción de señal copulándose con una proteína G. Como ejemplos de tales receptores, se incluyen, aunque sin limitación: el receptor de quimiokina CC 5 (CCR5), el receptor de quimiokina CXCR4, el receptor de tipo A de colecistokinina (CKAR), los receptores de adenosina, los receptores de somatostatina, los receptores de dopamina, los receptores colinérgicos muscarínicos, los receptores alfa-adrenérgicos, los receptores beta-adrenérgicos, los receptores de opiáceos, los receptores de cannabinoides, el factor de liberación de la hormona del crecimiento, el glucagón, los receptores de AMPc, los receptores de serotonina (5-HT), los receptores de histamina H2, los receptores de trombina, los receptores de quinina, los receptores de la hormona estimulante del folículo, las opsinas y rodopsinas, los receptores odoríferos, los GPCR de citomegalovirus, los receptores de histamina H2, los receptores de octopamina, los receptores de N-formilo, los receptores de anafilatoxina, los receptores del tromboxano, los receptores de IL-8, los receptores del factor activador de plaquetas, los receptores de endotelinas, el receptor del péptido liberador de bombesina gastrina, los receptores de bombesina que prefieren neuromedina B, los receptores del péptido intestinal vasoactivo, los receptores de neurotensina, los receptores de bradiquinina, los receptores de la hormona liberadora de tirotropina, los receptores de la sustancia P, los receptores de neuromedina K, los receptores de tipo I de la angiotensina II renal, los receptores del oncogén mas (angiotensina), los receptores de lutropina-coriogonadotropina, los receptores de tirotropina, los receptores de la hormona estimulante del folículo, los receptores de cannabinoides, los receptores inducidos por glucocorticoides, los GPCR de las células endoteliales, los GPCR del testículo y los GPCR de la aorta torácica, y homólogos de los mismos que tienen una homología de al menos un 80% con al menos uno de los dominios de transmembrana 1-7, como se describe aquí. Véase, v.g., Probst y col., DNA and Cell Biology 11: 1-20 (1992), aquí incorporado en su totalidad como referencia. El término abarca además subtipos de los receptores nombrados y mutantes y homólogos de los mismos, junto con las secuencias de ADN que los codifican.

El término “membrana” se refiere en general a una bicapa lipídica. Preferiblemente, la bicapa lipídica es la membrana plasmática que delimita una célula, pero puede ser cualquier membrana celular. El término membrana incluye también estructuras de bicapa, tales como liposomas artificiales.

El término “polipéptido GPCR” incluye polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que corresponde substancialmente a al menos un fragmento de 10 a 50 (v.g., 10, 20, 25 ó 30 residuos) aminoácidos y/o una secuencia homóloga de un GPCR conocido o grupo de GPCR, donde el polipéptido GPCR tiene homología de al menos un 80%, tal como un 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100% de homología, manteniendo actividad moduladora de GPCR, donde un polipéptido GPCR de la presente invención no es de origen natural o es de origen natural, pero está en forma purificada o aislada que no aparece en la naturaleza.

Preferiblemente, un polipéptido GPCR de la presente invención corresponde substancialmente a un dominio de transmembrana de un GPCR. También se prefieren polipéptidos GPCR en los que la secuencia de aminoácidos del GPCR tiene una longitud de 5-10 a 50 aminoácidos, tal como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50 aminoácidos, o cualquier rango dentro de éste.

El término “se inserta espontáneamente en una membrana” significa que un péptido que se pone en contacto con una membrana se autoorganizará, en condiciones fisiológicas, en la bicapa lipídica de tal forma que la porción hidrofóbica del péptido esté dentro de la membrana y cualquier extremo cargado quede expuesto a cualquiera de las superficies de una membrana. Preferiblemente, las moléculas de la presente invención que tienen una carga neta negativa en un extremo se orientarán de tal forma que el extremo cargado dé a la superficie extracelular de la célula.

El término “célula tumoral” o “célula cancerosa” o “célula neoplásica” denota una célula que demuestra una proliferación no regulada inapropiada. Se dice que una línea celular es “maligna” si, cuando se inyecta la línea celular en un animal hospedador, el animal hospedador desarrolla tumores o cánceres que son anaplásicos, invasivos y/o metastáticos. Un tumor “humano” está constituido por células que tienen cromosomas humanos. Dichos tumores incluyen los de un paciente humano y tumores resultantes de la introducción de una línea celular maligna humana en un animal no humano si las células de dichos tumores tienen cromosomas humanos.

Los términos “tratamiento del cáncer”, “terapia del cáncer” y similares significan generalmente un tratamiento que causa cualquier mejoría en un mamífero que tiene un cáncer, donde la mejoría se debe al tratamiento con un péptido de la invención. La mejoría puede ser subjetiva u objetiva. Por ejemplo, si el mamífero es humano, el paciente puede notar un mayor vigor o vitalidad o un menor dolor como síntomas subjetivos de mejoría o respuesta a la terapia. Alternativamente, el clínico puede observar una disminución en el tamaño del tumor o en la carga tumoral en base al examen físico, a los parámetros de laboratorio, a los marcadores tumorales o a los hallazgos radiográficos.

La expresión “inhibición del crecimiento tumoral [o celular]” significa generalmente que la velocidad de aumento en la masa, el tamaño, el número y/o el metabolismo de las células y/o tumores tratados es más lenta como resultado del tratamiento que la de las células y/o tumores no tratados. El crecimiento de una línea celular o tumor se dice que es “inhibido” por un tratamiento si, cuando se estudia por medios tales como la incorporación de radioisótopos a las células, las células tratadas aumentan en número a un ritmo menor que la velocidad de proliferación de las células control no tratadas, y preferiblemente menor de aproximadamente el 50% de la velocidad de proliferación de las células no tratadas. Más preferiblemente, la velocidad de crecimiento se inhibe en al menos un 80%. Si se estudia el crecimiento por un medio tal como plaqueo en metilcelulosa, se dice que el crecimiento de una línea celular resulta “inhibido” si las células tratadas dan lugar a menos que el número de colonias que crecen a partir de un número similar de células no tratadas. Preferiblemente, el número de colonias procedentes de células tratadas es menor de aproximadamente el 70% del número procedente de células no tratadas. Más preferiblemente, el número de colonias se reduce en al menos un 50%. “Inhibición del crecimiento celular” también incluye el crecimiento cero y, lo que es más importante, la consiguiente muerte de las células tumorales y la erradicación del tumor. Cuando se mide *in vivo*, la “inhibición del crecimiento tumoral” abarca menos tumores o más pequeños (por ejemplo, de menor diámetro) en comparación con los animales control o los pacientes no tratados. La progresión de un tumor se refiere a fenómenos distintos del crecimiento, tales como cambios morfológicos y fisiológicos y cambios en la expresión génica y proteica.

Se puede evaluar la inhibición por cualquier método aceptado para medir si el crecimiento o el tamaño del tumor y/o el aumento de células cancerosas o tumorales se han enlentecido, detenido o revertido. Esto incluye la observación directa y la evaluación indirecta, tal como síntomas subjetivos o signos objetivos. El clínico puede observar una reducción del tamaño tumoral o de la carga tumoral (número de tumores) en base al examen físico, a los parámetros de laboratorio, a los marcadores tumorales o a los hallazgos radiográficos. Alternativamente, si el mamífero es un humano, el paciente puede observar un mayor vigor o vitalidad o un menor dolor como síntomas subjetivos de mejoría o respuesta a la terapia. Algunos signos de laboratorio que el clínico puede observar como respuesta a la terapia incluyen la normalización de pruebas tales como el recuento de células blancas de la sangre, el recuento de células rojas de la sangre, el recuento de plaquetas, la velocidad de sedimentación de los eritrocitos y diversos niveles enzimáticos tales como las transaminasas y las hidrogenasas. Adicionalmente, el clínico puede observar una reducción en un marcador tumoral detectable tal como el antígeno específico prostático (PSA) o el antígeno corioembrionario (CEA). Alternativamente, se pueden usar otras pruebas para evaluar la mejoría objetiva, tales como sonogramas, barridos de tomografía axial computarizada, barridos de resonancia magnética nuclear y pruebas de emisión de positrones.

El término “péptido de transmembrana GPCR” puede incluir un fragmento de dominio de transmembrana GPCR y/o un péptido homólogo del mismo, de al menos 5-50, y preferiblemente de 5-30, y preferiblemente de al menos 10-30 aminoácidos de longitud, tal como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50 aminoácidos, o cualquier rango dentro de éste o cualquier secuencia correspondiente que tenga substituciones conservadoras de aminoácidos. Como muestras de péptidos de transmembrana de la invención, se incluyen, aunque sin limitación, los péptidos enlistados en la Tabla I de la presente descripción. Un péptido de transmembrana preferido de la presente invención, cuando contacta con una estructura celular o de membrana (v.g., liposoma) que contiene un GPCR biológicamente activo, modula la actividad biológica de dicho GPCR *in vitro*, *in vivo* o *in situ*. La concentración del péptido en una solución que contacta con la célula *in vivo* (v.g., plasma sanguíneo o fluido intersticial) o *in vitro* (v.g., medio de cultivo) es de entre 1 nanomolar y 50 micromolar, preferiblemente de entre 1 nanomolar y 1 micromolar y más preferiblemente menor de 5 micromolar.

El término “residuo” se refiere a un aminoácido o mimético de aminoácido incorporado en un oligopéptido por un enlace amida o un mimético de enlace de amida.

“Cargado negativamente” se refiere a aquellos aminoácidos, derivados de aminoácidos, miméticos de aminoácidos y restos químicos que están cargados negativamente a pH fisiológico. Como aminoácidos cargados negativamente, se incluyen, por ejemplo, Asp y Glu. Un residuo “ácido” es un residuo que está cargado negativamente a pH fisiológico.

“Cargado positivamente” se refiere a aquellos aminoácidos, derivados de aminoácidos, miméticos de aminoácidos y restos químicos que están cargados positivamente a pH fisiológico. Como aminoácidos cargados positivamente, se incluyen, por ejemplo, Lys y Arg. Un “residuo básico” es un residuo que está positivamente cargado a pH fisiológico.

“Neutro” se refiere a aquellos aminoácidos, derivados de aminoácidos, miméticos de aminoácidos y restos químicos que no están cargados ni positiva ni negativamente a pH fisiológico.

Secuencia “consenso” se refiere a péptidos que son distintos de las secuencias GPCR conocidas en cuanto a características estructurales críticas, pero que derivan de secuencias consenso de los dominios de transmembrana de GPCR 1-7 homólogos. Dichos péptidos consenso pueden ser derivados por modelado molecular, eventualmente combinado

con análisis de hidrofobicidad y/o ajuste a hélices modelo, como ejemplos no limitativos. Dicho modelado puede ser realizado según etapas de métodos conocidos usando algoritmos de modelado conocidos, tales como, aunque sin limitación, ECEPP, INSIGHT, DISCOVER, CHEM-DRAW, AMBER, FRODO y CHEM-X. Dichos algoritmos comparan dominios de transmembrana entre receptores copulados a proteína G relacionados, determinan probables estructuras con energía minimizada y definen fragmentos polipeptídicos consenso alternativos.

Se dice que una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico de un polipéptido GPCR de la presente invención “se corresponde substancialmente” con otra secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico, respectivamente, si la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico en ambas moléculas proporciona polipéptidos que tienen actividad biológica que es substancialmente similar, cualitativa o cuantitativamente, a la del correspondiente fragmento de al menos un dominio de transmembrana GPCR, o que pueden ser sinérgicos cuando dos o más dominios de transmembrana, secuencias consenso u homólogos de los mismos están presentes.

Adicional o alternativamente, dichas secuencias “substancialmente correspondientes” de polipéptidos GPCR incluyen sustituciones conservadoras de aminoácidos o nucleótidos o sustituciones de codones de nucleótidos degenerativas, donde las sustituciones individuales de aminoácidos o nucleótidos son bien conocidas en la técnica.

El término “modula una propiedad o actividad biológica” significa que, en presencia de un péptido de transmembrana de ensayo, un parámetro o fenómeno biológico mensurable aumenta o disminuye en relación a un control en ausencia de dicho péptido. Como ejemplos de propiedad o actividad biológica, se incluyen: la conformación del GPCR, la asociación del GPCR con otras moléculas, la transducción de señal, la secreción extracelular de proteínas celulares, los cambios conformacionales en proteínas, los cambios en la actividad enzimática, los cambios en la actividad metabólica, los cambios en la afinidad por un ligando, los cambios en los niveles de infección vírica, los cambios en la vasodilatación, la modulación del ritmo cardíaco, la modulación de la broncodilatación, la modulación de las secreciones endocrinas y la modulación del peristaltismo intestinal. Obsérvese que la actividad biológica del GPCR no necesita ser una que esté limitada al papel preciso *in vivo* desempeñado por el GPCR. El término también cubre las propiedades del GPCR, tales como la unión a proteínas víricas, que no son parte del papel biológico *in vivo* del GPCR. También cubre las propiedades intrínsecas de los GPCR que son sólo desentrañadas por manipulación experimental en el laboratorio, tales como la capacidad de los GPCR en bicapas artificiales (v.g., liposomas) para interaccionar con ligandos de GPCR.

“Transducción de señal” es el proceso mediante el cual se traduce la unión de un ligando a un receptor en un cambio fisiológico. En general, la unión de un ligando a un receptor provoca un cambio en una propiedad física del receptor, por ejemplo un cambio en su conformación, o en su orientación, o en su capacidad para unirse a otros ligandos. Este cambio en una propiedad física puede dar lugar, directa o indirectamente, a mayores o menores flujos de iones, a mayor o menor actividad enzimática, a mayor o menor desfosforilación, a mayor o menor translocación del receptor o de cualquier molécula (v.g., un resto de inositol o una subunidad de proteína G) de un compartimento celular a otro.

“Ligandos GPCR” se refiere a moléculas biológicas que se unen a los GPCR *in vitro*, *in situ* o *in vivo* y pueden incluir hormonas, neurotransmisores, virus o dominios de unión a receptores de los mismos, proteínas G, opsinas, rodopsinas, nucleósidos, nucleótidos, factores de la cascada de coagulación, odorizantes o feromonas, toxinas, factores estimulantes de colonias, factores de activación plaquetaria, péptidos neuroactivos, neurohumor o cualquier compuesto biológicamente activo, tal como fármacos o compuestos sintéticos o de origen natural.

La expresión “inhibe la infección por VIH” significa que un péptido de la invención inhibe la unión de un VIH a un GPCR o inhibe una actividad biológica del GPCR que media en la entrada y en la reproducción exitosa de un virus VIH en una célula que expresa GPCR.

El término “cantidad efectiva” significa una dosificación suficiente para producir un resultado deseado. El resultado deseado puede consistir en cambios subjetivos u objetivos en la actividad biológica de un GPCR, especialmente la transducción de señal. Las cantidades efectivas del polipéptido o composición GPCR, que pueden también incluir un derivado funcional del mismo, son de aproximadamente 0,01 microgramos a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, y preferiblemente de aproximadamente 10 microgramos a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, tal como 0,05, 0,07, 0,09, 0,1, 0,5, 0,7, 0,9, 1, 2, 5, 10, 20, 25, 30, 40, 45 ó 50 mg/kg.

Una “sustitución conservadora”, cuando se describe una proteína, se refiere a un cambio en la composición de aminoácidos de la proteína que no altera substancialmente la actividad de la proteína. Así, “variaciones conservadoramente modificadas” de una secuencia de aminoácidos particular se refiere a sustituciones de aminoácidos de aquellos aminoácidos que no son críticos para la actividad de la proteína o a sustitución de aminoácidos con otros aminoácidos que tienen propiedades similares (v.g., ácidos, básicos, cargados positiva o negativamente, polares o no polares, etc.), de tal forma que las sustituciones incluso de aminoácidos críticos no alteran substancialmente la actividad. Se conocen bien en la técnica tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Dichas sustituciones son preferiblemente realizadas según la lista siguiente, cuyas sustituciones pueden ser determinadas por experimentación rutinaria y proporcionan propiedades estructurales y funcionales modificadas de una molécula polipeptídica sintetizada, manteniendo al mismo tiempo la unión a receptores, o inhibiendo o imitando la actividad biológica, según se determina mediante ensayos conocidos de actividad de los receptores GPCR.

ES 2 299 242 T3

	Residuo original	Ejemplo de substitución
5	Ala	Gly;Ser
	Arg	Lys
	Asn	Gln;His
10	Residuo original	Ejemplo de substitución
	Asp	Glu
15	Cys	Se
	Gln	Asn
	Glu	Asp
20	Gay	Ala;Pro
	His	Asn;Gln
	Ile	Leu;Val
25	Leu	Ile;Val
	Lys	Arg;Gln;Glu
	Met	Leu;Tyr;lle
30	Phe	Met;Leu;Tyr
	Se	Thr
35	Residuo original	Ejemplo de substitución
	Thr	Se
40	Trp	Tyr
	Tyr	Trp;Phe
	Val	Ile;Leu

45 Dicho de manera diferente, los seis grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son substituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 50 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparragina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 55 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V), y
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

60 Véase también Creighton (1984) PROTEINS, W.H. Freeman and Company. Además, las substituciones, deleciones o adiciones individuales que alteran, añaden o suprimen un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en una secuencia codificada son también “variaciones conservadoramente modificadas”.

65 El término “identidad substancial” o “similitud substancial” en el contexto de un polipéptido indica que un polipéptido tiene una secuencia que puede tener una identidad de secuencia del 40% con una secuencia de referencia, o preferiblemente del 70%, o más preferiblemente una identidad de secuencia del 85% con la secuencia de referencia, o más preferiblemente una identidad del 90% sobre una ventana de comparación de aproximadamente 10-20 residuos

de aminoácido. “Porcentaje de identidad de aminoácidos” o “porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos” se refiere a una comparación de los aminoácidos de dos polipéptidos que, cuando se alinean óptimamente, tienen aproximadamente el porcentaje designado de los mismos aminoácidos. Por ejemplo, “un 95% de identidad de aminoácidos” se refiere a una comparación de los aminoácidos de dos polipéptidos que, cuando se alinean óptimamente, tienen un 95% de identidad de aminoácidos. Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticos difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos. Como los aminoácidos substituidos tienen propiedades similares, las substituciones no cambian las propiedades funcionales de los polipéptidos. Una indicación de que dos secuencias polipeptídicas son substancialmente idénticas es que un péptido es inmunológicamente reactivo con anticuerpos producidos contra el segundo péptido. Así, un polipéptido es substancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren sólo por una substitución conservadora. Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son substancialmente idénticas es que el polipéptido al que codifica el primer ácido nucleico presenta reacción inmunológicamente cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son substancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones estrictas.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen las secuencias de ensayo y de referencia en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de ensayo en relación a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa designados.

Se puede realizar la alineación óptima de secuencias para comparación, v.g., por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Programas de Genética de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual (véase, en general, Ausubel y col., antes citado).

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencia múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones progresivas por pares para mostrar la relación y el porcentaje de identidad de secuencia. También representa un árbol o dendrograma que muestra las relaciones de agrupamiento usadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del método de alineación progresiva de Feng y Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35: 351-360 (1987). El método empleado es similar al método descrito por Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989). El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineación múltiple comienza con la alineación por pares de las dos secuencias más similares, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. Este grupo es luego alineado con la siguiente secuencia o grupo de secuencias alineadas más relacionadas. Dos grupos de secuencias son alineados por una extensión simple de la alineación por pares de dos secuencias individuales. Se consigue la alineación final por una serie de alineaciones progresivas por pares. Se desarrolla el programa designando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos o nucleótidos para regiones de comparación de secuencias y designando los parámetros del programa. Por ejemplo, se puede comparar una secuencia de referencia con otras secuencias de ensayo para determinar el porcentaje de relación de identidad de secuencia utilizando los siguientes parámetros: peso de hueco por defecto (3,00), peso de longitud de hueco por defecto (0,10) y huecos de extremos pesados.

Otro ejemplo de algoritmo adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y de similitud de secuencias es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). El programa para realizar análisis BLAST es de disponibilidad pública a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo conlleva la identificación primeramente de pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema que o bien se correspondan o bien satisfagan alguna puntuación de umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. Se hace referencia a T como el umbral de puntuación de palabras de la vecindad (Altschul y col., antes citado). Estos aciertos de palabras de la vecindad iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que las contienen. Los aciertos de palabras son entonces prolongados en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se puede aumentar la puntuación de alineación acumulativa. Se detiene la prolongación de los aciertos de palabras en cada dirección cuando: la puntuación de alineación acumulativa cae en la cantidad X desde su máximo valor alcanzado; la puntuación acumulativa va a cero o por debajo de cero debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos que puntúan negativamente; o se alcanza el extremo de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa como defectos una longitud de palabras (W) de 11, alineaciones de la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)) (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas hebras.

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, v.g., Karlin y Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad con la cual se produciría una correspondencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos por azar. Por ejemplo, se considera que un ácido nucleico

es similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01 y más preferiblemente menor de aproximadamente 0,001.

5 El término “ácido nucleico” se refiere a deoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de éstos en forma de una sola o de doble hebra. A menos que se limite específicamente, el término incluye ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de forma similar a los nucleótidos naturales. A menos que se indique en contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también incluye implícitamente variantes de la misma conservadoramente modificadas (v.g. sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Concretamente, se pueden conseguir sustituciones de codones degenerados generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o de todos) está substituida con residuos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzner y col., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka y col., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); y Cassol y col., 1992; Rossolini y col., *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)). Se usa el término ácido nucleico indistintamente con gen, ADNc y ARNm codificado por un gen.

La expresión “una secuencia de ácido nucleico codificante” se refiere a un ácido nucleico que contiene información de secuencia para un ARN estructural tal como ARNr, un ARNt o la secuencia primaria de aminoácidos de una proteína o péptido específicos, o un sitio de unión para un agente regulador de trans-acción. Esta expresión incluye específicamente codones degenerados (es decir, diferentes codones que codifican para un solo aminoácido) de la secuencia o secuencias nativas que pueden ser introducidos para conformarse a la preferencia de codones en una célula huésped específica.

“Sondas de ácido nucleico” pueden ser fragmentos de ADN o de ARN. Se pueden preparar fragmentos de ADN, por ejemplo, digiriendo ADN plasmídico, o usando PCR, o se pueden sintetizar por el método de la fosforamidita descrito por Beaucage y Carruthers, *Tetrahedron Lett.* 22:1859-1862 (1981), o por el método de los triésteres según Matteucci, y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 103:3185 (1981), ambos aquí incorporados como referencia. Se puede obtener entonces un fragmento de doble hebra, si se desea, hibridando las hebras simples químicamente sintetizadas entre sí en condiciones apropiadas o sintetizando la hebra complementaria usando ADN polimerasa con una secuencia cebadora apropiada. Cuando se da una secuencia específica para una sonda de ácido nucleico, se entiende que también se identifica e incluye la hebra complementaria. La hebra complementaria funcionará igual de bien en situaciones en las que el objetivo es un ácido nucleico de doble hebra.

Los términos “identidad substancial” o “identidad de secuencia substancial”, aplicados a secuencias de ácidos nucleicos y tal como se usan aquí, denotan una característica de una secuencia polinucleotídica, donde el polinucleótido tiene una secuencia que tiene al menos un 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos de un 90 a un 95 por ciento de identidad de secuencia y más preferiblemente al menos un 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones nucleotídicas, frecuentemente en una ventana de al menos 25-50 nucleótidos, donde el porcentaje de identidad de secuencia es calculado comparando la secuencia de referencia con la secuencia polinucleotídica, que puede incluir delecciones o adiciones que totalicen un 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia en la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor.

La expresión “se une específicamente a un anticuerpo” o “específicamente inmunorreactivo con”, cuando hace referencia a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinativa de la presencia de la proteína en presencia de una población heterogénea de proteínas y de otros productos biológicos. Así, en las condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína particular y no se unen en cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo en tales condiciones puede requerir un anticuerpo seleccionado por su especificidad para una proteína particular. Se pueden usar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan rutinariamente inmunoensayos de ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase Harlow y Lane (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Publications, New York, para una descripción de formatos de inmunoensayo y de condiciones que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica.

55 Descripción detallada

Todas las referencias aquí citadas, incluyendo los artículos de revistas o resúmenes, solicitudes de patente EE.UU. o extranjeras publicadas o correspondientes, patentes EE.UU. o extranjeras concedidas o cualquier otra referencia, quedan incluidas aquí en su totalidad, incluyendo todos los datos, tablas, figuras y texto presentados en las referencias citadas. Adicionalmente, los contenidos de las referencias citadas en las referencias aquí citadas quedan también incorporados en su totalidad a modo de referencia.

La presente invención se basa parcialmente en evidencias de que los dominios de transmembrana (TM) de los GPCR interaccionan de una forma específica en el montaje de las moléculas de los receptores. Estas interacciones no conducen a una estructura rígida, ya que se requiere algo de flexibilidad para permitir hacer cambios conformacionales después de la unión de ligandos para obtener la capacidad de la molécula para dar una señal desde la superficie celular hasta las partes intracelulares. También se demostró para varios GPCR que los dominios de transmembrana están

implicados en la unión de ligandos y por ello contienen aberturas que permiten la penetración de los ligandos. Informes de que la expresión de dominios de transmembrana ausentes rescata receptores truncados inactivos de vasopresina V2, beta-adrenérgicos y muscarínicos M3 (Schoneberg y col., EMBO J. 15: 1283 (1996); Wong y col., J. Biol. Chem. 265: 6219 (1990); Monnot y col., J. Biol. Chem. 271: 1507 (1996); Gudermann y col., Annu. Rev. Neurosci. 20: 399 (1997); Osuga y col., J. Biol. Chem. 272: 25006 (1997)) sugirieron que el péptido derivado del sexto dominio de transmembrana del receptor P2-adrenérgico resultaba inhibir la activación y dimerización de receptores (Hebert y col., J. Biol. Chem., 271 (27): 16384-92 (1996)). Todas estas observaciones nos sugerían que dirigirse a las interacciones de transmembrana de los GPCR puede regular específicamente la función de los GPCR.

La naturaleza hidrofóbica de los péptidos de transmembrana hace altamente probables sus penetraciones en la bicapa. La orientación dentro de la membrana puede ser controlada por adición de residuos cargados al extremo que se supone que es extracelular.

1. *Péptidos GPCR*

Los polipéptidos GPCR de la presente invención, o los ácidos nucleicos que los codifican, incluyen un grupo finito de secuencias substancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que pueden ser rutinariamente obtenidos por alguien con conocimientos ordinarios en la técnica, sin excesiva experimentación, en base a las enseñanzas y a las directrices que aquí se presentan. Para una descripción detallada de la química y estructura de las proteínas, véase Schulz y col., PRINCIPLES OF PROTEIN STRUCTURE, Springer-Verlag, New York, 1978, y Creighton, T. E., PROTEINS: STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983. Para una presentación de sustituciones de secuencias nucleotídicas, tales como preferencias de codones, véase Ausubel y col., antes citado, en las secciones A.1.1-A.1.24, y Sambrook y col., antes citado, en los Apéndices C y D.

Los polipéptidos GPCR incluyen secuencias homólogas y/o fragmentos de al menos uno de los dominios de transmembrana 1-7 de uno o más GPCR u homólogos de los mismos, cuyos polipéptidos GPCR no son de origen natural y/o se presentan en forma aislada y/o purificada que no se encuentra en la naturaleza.

Sin embargo, en el contexto de la presente invención, se prefieren polipéptidos GPCR de más de 15-20 aminoácidos para que los polipéptidos GPCR sean capaces de extenderse por la bicapa lipídica.

Se prefiere en particular seleccionar los péptidos de la invención o modificarlos de tal forma que un extremo esté cargado y el otro sea neutro en condiciones fisiológicas. Esto es para que el péptido se inserte espontáneamente en una membrana. Es particularmente importante que el péptido se inserte en la misma orientación que el dominio de GPCR de transmembrana del que deriva.

Los péptidos de la invención pueden derivar de cualquiera de los 7 dominios de TM. Como ejemplos ilustrativos no limitativos de dominios de transmembrana TM1 y TM2 de GPCR que se usan para generar moléculas de la presente invención, se incluyen los siguientes:

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 299 242 T3

TM1

	101		150
GPCRAelegans	GPCRAelegans	GPCRAelegans	GPCRAelegans
GRH	GRH	GRH	GRH
TRH	TRH	TRH	TRH
FSHprec	FSHprec	FSHprec	FSHprec
TSHprec	TSHprec	TSHprec	TSHprec
LH_CGprec	LH_CGprec	LH_CGprec	LH_CGprec
PGE_EP1	PGE_EP1	PGE_EP1	PGE_EP1
PGE_EP2	PGE_EP2	PGE_EP2	PGE_EP2
PGE_EP3	PGE_EP3	PGE_EP3	PGE_EP3
PGF	PGF	PGF	PGF
PGI	PGI	PGI	PGI
TXA2	TXA2	TXA2	TXA2
PAF	PAF	PAF	PAF
M2	M2	M2	M2
M4	M4	M4	M4
M1	M1	M1	M1
M3	M3	M3	M3
M5	M5	M5	M5
H1	H1	H1	H1
H2	H2	H2	H2
5HT1A	5HT1A	5HT1A	5HT1A
5HT1B	5HT1B	5HT1B	5HT1B
5HT1D	5HT1D	5HT1D	5HT1D
5HT1E	5HT1E	5HT1E	5HT1E
5HT1F	5HT1F	5HT1F	5HT1F
5HT2A	5HT2A	5HT2A	5HT2A
5HT2B	5HT2B	5HT2B	5HT2B
5HT2C	5HT2C	5HT2C	5HT2C
5HT5A	5HT5A	5HT5A	5HT5A
5HT5Brat	5HT5Brat	5HT5Brat	5HT5Brat
5HT6rat	5HT6rat	5HT6rat	5HT6rat
5HT7	5HT7	5HT7	5HT7
alpha1A	alpha1A	alpha1A	alpha1A
alpha1B	alpha1B	alpha1B	alpha1B
alpha1C	alpha1C	alpha1C	alpha1C
alpha2A	alpha2A	alpha2A	alpha2A
alpha2B	alpha2B	alpha2B	alpha2B
alpha2C1	alpha2C1	alpha2C1	alpha2C1
alpha2C2	alpha2C2	alpha2C2	alpha2C2
beta1	beta1	beta1	beta1
beta2	beta2	beta2	beta2
beta3	beta3	beta3	beta3
beta4turkey	beta4turkey	beta4turkey	beta4turkey
D1A	D1A	D1A	D1A
D2	D2	D2	D2
D3	D3	D3	D3
D4	D4	D4	D4
D5	D5	D5	D5
A1	A1	A1	A1
A2a	A2a	A2a	A2a
A2b	A2b	A2b	A2b
A3	A3	A3	A3
OCdrome	OCdrome	OCdrome	OCdrome
ACTH	ACTH	ACTH	ACTH
MSH	MSH	MSH	MSH
MC3	MC3	MC3	MC3
MC4	MC4	MC4	MC4
MC5	MC5	MC5	MC5
melatonina	melatonina	melatonina	melatonina
oxitocina	oxitocina	oxitocina	oxitocina
conopressinLs	conopressinLs	conopressinLs	conopressinLs
V1A	V1A	V1A	V1A

V1B WLGRDEELAK VEIGVLATVL VLATGGNLAV LLTLGQLGRKRSR
 V2 LDTRDPLLAR AELALLSIVF VAVALSNGLV LAALA.....RRGRRGHWAP
 CCK_A PRPSKEWQPA VQILLXSLIF LLSVLGNTLV ITVLI.....RNKRM..RTV
 CCK_B GAGTRELELA IRITLYAVIF LMSVGGNMLI IVVLGLS... ..RRL..RTV
 5 NPY1 DCHLPLAMIF TLALAYGAVI ILGVSGNLAL IIIIL.....KQKEM..RNV
 NTR DVNTDIYSKV LVTAVYLALF VVGTVGNTVT AFTLAR....KKSLSQSLST
 NK1 QFVQPAWQIV LWAAAYTVIV VTSVVGNVVV MWIILA....HKRM..RTV
 NK2 AFSMPSWQLA LWAPAYLALV LVAVTGNALV IWIILA....HRRM..RTV
 NK3 QFVQPSWRIA LWSLAYGVVV AVAVLGNLIV IWIILA....HKRM..RTV
 10 blueops YHIAPVWAFY LQAAMGTVP LIGFPLNAMV LVATL.....RYKKL..RQP
 greenops YHIAPRWVYH LTSVWMIFVV IASVFTNGLV LAATM.....KPKKL..RHP
 redops YHIAPRWVYH LTSVWMIFVV TASVFTNGLV LAATM.....KPKKL..RHP
 rodopsina YLLAEPWQFS MLAAFMELLI VLGFPINFLT LYVTVQ....HKKL..RTP
 violetopsGg YHIAPPWAFY LQTAFMGIVF AVGTPLNAVW LWVTVRYKRLRQP
 opsin_crab FPPMNPLWYS ILGVAMIILG IICVLGNGMV IYLMMTTKSLRTP
 15 ET_Aprec QTKITSAPKY INTVISCTIF IVGMVGNATL LRIIYQ....NKCM..RNG
 ET_Bprec PIEIKETFKY INTVVSCLVF VLGIIIGNSTL LRIIYKKN... ..CM..RNG
 ET_Cfrog RAKIRHAFKY VTTILSCVIF LVGIVGNSTL LRIIYKKN... ..CM..RNG
 galanin PLFGIGVENF VTLVVFGLIF ALGVLGNSLV ITVLARSK... ..PGKPRST
 NMB GTTTELVIRC VIPSLYLLII TVGLLGNIML VKIFITNS... ..AM..RSV
 GRP DDWSHPGILY VIPAVYGVII LIGLIGNITL IKIFCTVK... ..SM..RNV
 20 BRS3 DNSPGIEALC AIYITYAVII SVGILGNAIL IKVFFKTK... ..SM..QTV
 deltaOP GSASSLALAI AITALYSAVC AVGLLGNVLV MFGIVRYT... ..KM..KTA
 kappaOP PAHISPAIPV IITAVYSVVF VVGLVGNLSV MFVIRYR... ..KM..KTA
 muOP GSP.SMITAI TIMALYSIVC VVGLFGNPLV MYVIVRYT... ..KM..KTA
 OPRX GAFLPLGLKV TIVGLYLAVC VGLLGNCLV MYVILRHT... ..KM..KTA
 CB1 FMVLNPSQQL AIAVLSLTIG TFTVLENLLV LCVILHSR... ..SLRCR...P
 CB2 YMILSGPQKT AVAVLCTLLG LLSALENVAV LYILSSSH... ..QLRRK...P
 25 SSTR1 TLSEGOSSAI LISFIYSVVC LVGLCGNSMV IYVILRYA... ..KM..KTA
 SSTR2 EPYYDLTSA VLTFIYFVVC IIGLCGNTLV IYVILRYA... ..KM..KTI
 SSTR3 SPAGLAVSGV LIPLVYLVC VVGLLGNLSV IYVILRHT... ..AS..PSV
 SSTR4 GDARAAG.MV AIQCIYALVC LVGLVGNALV IFVILRYA... ..KM..KTA
 SSTR5 PAPSAGARAV LVPVLYLLVC AAGLGGNTLV IYVILRFA... ..KM..KTV
 30 IL8A MLETETLNKY VVIIAYALVF LLSLLGNSLV MLVILYSR... ..VG..RSV
 IL8B EPESLEINKY FVVIYALVF LLSLLGNSLV MLVILYSR... ..VG..RSV
 AT1a KAGRHNIFV MIPTLYSIIF VVGIFGNSLV VIVIYFYM... ..KL..KTV
 AT1brat KAGRHNIFV MIPTLYSIIF VVGIFGNSLV VIVIYFYM... ..KL..KTV
 AT2 QKPSDKH.LD AIPILYIIF VIGFLVNIIV VTLFCCQK... ..GP..KKV
 BK1 APEAWDLLHR VLPTFIISIC FFGLLGNLFV LLVFLPR... ..RQLNV
 BK2 QVEWLGWLT IQPPFLWLV VLATLENIFV LSVFCLHK... ..SSCTV
 35 P2Y7 PSLGVEFISL LAIILLVAL AVGLPGNSFV VWSILKRMQ... ..KRSV
 P2Y6 CVYREDFKRL LLPPVYSVVL VVGLPLNVCV IAQICASRR... ..TLTR
 P2Y5 CSTEDSFKYT LYGCVFMSVF VGLLIANCVA IYIFTFTLK... ..VRNE
 P2Y4 CWFDEDFKFI LLPVSYAVVF VLGLGLNAPT LWFIFRLR... ..PWDA
 P2Y3chick CTFHEEFKQV LLPLVYSVVF LLGLPLNAVW IGQIWLARK... ..ALTR
 P2Y2 CRFNEDFKYV LLPVSYGVVC VGLCLNAVW LYIFLCRLK... ..TWN
 P2Y1 ALTKTGQFY YLPAVYILVF IIGFLGNSVA IWMFVFHMK... ..PWSG
 40 THRprec GYLTSWLT LALVIFAVVF LVGVGNALV VVTAPEA... ..K...RTI
 C5a TSNTLRVPDI LALVIFAVVF LVGVGNALV VVTAPEA... ..K...RTI
 GP01mouse AESEPELVVN PWDIVLCSSG TLICCENAVV VLIIF.HSPS LR.....AP
 R334rat VESEPELVVN PWDIVLCSSG TLICCENAVV VLIIF.HSPS LR.....AP
 GP21mouse GPATLLPSPR AWDVVLCSG TLVSCENALV VAIIV.GTPA FR.....AP
 45 GCRCmouse AESQNPVKA LLIVAYSFTI VFSLFGNVLV CHVIFK.NQRMHSA
 TXKR ...OPPWAVAL LWSLAYGAVV AVAVLGNLVV IWIVLA.HKR MR.....TV
 G10Drat MELNENTKQV VLFVFLAIF VVGLVENLVV IC.VNCRSG R.....VGM
 RDC1 NMPNKSULLY TLSFIYIFIF VIGMIANSVV VW.VNIOAKT TGYDT.....
 BLR1 ...MASFKAV FVPVAYSILF LLGVIGNLVV LV.ILERHRQ TRSSTE....
 CL5 REENANFNKI FLPTIYSIIF LTGIVGNGLV IL.VMGYQKK LRSMTDKYR..
 50 LCR1 REENANFNKI FLPTIYSIIF LTGIVGNGLV IL.VMGYQKK LRSMTDKYR..
 EB11 KKDVRNFKAW FLPTIYSIIF FVGLLGNGLV VL.TYIYFKR LKMTDTY..
 RBS1rat LGDIVAFGTI FLSIFYSLVF TFGLVGNLLV VL.ALTNSRK SKSITDIY..
 EB12 LYAHHSTARI VMPLHYSLVF IIGLVGNLLA LV.VIVQNRK KINSTTLY..
 GCRTchick CSTEDSFKYT LYGCVFMSVF VGLLIANCVA IY.IFTFTLK VRNETTLY..
 APJ EYTDWKSSGA LIPAIYMLVF LLGTTGNGLV LWTVFRSSRE KRRSAD....
 RTArat EQIATLPPPA VTNYIFLLC LCGLVGNGLV LWFFGFSIK... ..RT.....P
 55 UHRrat SLQLVHQLKG LIVMLYSIVV VVGLVGNCLL VLVIARVR... ..RLHNV
 FMRL1 EPAGHTVLWI FSLLVHGVTF VFGVLGNGLV IWVA.GFR... ..MTRTV
 FMRL2 ESAGYTVLRI LPLVVGLVTF VLGVLGNGLV IWVA.GFR... ..MTRTV

ES 2 299 242 T3

```

fMLP VSAGYLFLLDI ITYLVFAVTF VLGVLGNGLV IWVA.GFR.. .....MHTTV
OLF1catfish NGFYNIPTK YYYAFLCIAY AVTVLGNSTI MCTIYLAR.. .....SLHTA
OLF3catfish TGLYNIPHAH YYYLFLCFVY TVTFLGNSFI MGTYILAR.. .....SLHTA
5 OLF8catfish GFHDLGEWGP ILSIPYLLMF LLSSTSNLTL IYLIISOR.. .....ALHSP
OLF32Acatfish SGFSGIPFSQ YYYAFLIFIY IISLCGNSIV LFMILVDR.. .....TLHIP
OLF32Bcatfish SGFSGIPFSQ YYPVFLIFIY IISLCGNSIV LFMILVDR.. .....TLHIP
OLF32Ccatfish SGFSGIPFSQ YYPVFLIFIY IISLCGNSIV LFMILVDR.. .....TLHIP
OLF32Dcatfish SGFSGIPFSQ YYPVFLIFIY IISLCGNSIV LFMILVDR.. .....TLHIP
OLF47catfish IAYNSLGNKN YLILALGIY LITLLCNFTL LAIILMNS.. .....SLQNP
10 OLF202catfish FPGLPNNYVG LVSVMVFVY VCTLIGNCTF FTLFLREK.. .....SLQKP
OLFCOR1chicken LTD.NPGLQM PLFMVFLAIY TITLLTNLGL IALISVDL.. .....HLQTP
OLFCOR2chicken LTD.NPGLQM PLFMVFLAIY TITLLTNLGL IALIGMDL.. .....HLQTP
OLFCOR3chicken LTD.NPGLQM PLFMVFLAIY TITLLTNLGL IRLISVDL.. .....HLQTP
OLFCOR4chicken LTD.NPGLQM PLFMVFLAIY TITLLTNLGL IRLISVDL.. .....HLQTP
OLFCOR5chicken LTD.NPGLQM PLFMVFLAIY TITLLTNLGL IALISVDF.. .....HLQTP
OLFCOR6chicken LTD.NPGLQM PLFMVFLAIY TITLLTNLGL IALIRIDL.. .....QLQTP
15 OLFdog LPI.DPDQD LFYALFLAMY VTTILGNLLI IVLIQLDS.. .....HLHTP
OLFO7E MSE.SPEQQQ ILFWMLSMY LVTTVGNVLI ILAISSDS.. .....RLHTP
OLFO7I LPI.QPEQQN LCYALFLAMY LTTLLGNLLI IVLIRLDS.. .....HLHTP
OLFO7J FSS.FHEQQI TLFGVFLAIY ILLAGNIII VTIIRIDL.. .....HLHTP
OLFOR3mouse VSD.HPHLEI IFFAVILASY LTLVGNLTI ILLSRLDA.. .....RLHTP
OLFrat LTK.QPELLL PLFFLFLVIY VLTVGNLGM ILLIIVSP.. .....LLHTP
20 OLFF3rat FVE.NKDLQP LIYGLFLSMY LVTVIGNISI IVAISDP.. .....CLHTP
OLFF5rat LSR.QPQQQQ LLFLLFLIMY LATVLGNLLI ILAIGTDS.. .....RLHTP
OLFF6rat FPG.PRSMRI GLFLLFLVMY LTVVGNLAI ISLVGAHR.. .....CLQTP
OLFF12rat FTE.NPQLHF LIFALFLSMY LVTVLGNLLI IMAITQS.. .....HLHTP
OLFI3rat LPI.PEEHQH LFYALFLVMY LTTILGNLLI IVLVQLDS.. .....QLHTP
OLFI7rat FPA.PAPLRV LLFFLSLLXY VLVLTENMLI ITAIRNHP.. .....TLHQP
OLFI8rat LPI.PPEHQH LLFLLFLIMY LTTFLGNLLI VVLVQLDS.. .....HLHTP
25 OLFI9rat LPI.PPEYQH LFYALFLAMY LTTLLGNLLI IILILLDS.. .....HLHTP
OLFI14rat LPI.PSEYHL LFYALFLAMY LTTILGNLLI IVLVRLDS.. .....HLHMP
OLFI15rat LPI.PSEHQH VFYALFLSMY LTTVLGNLLI IILIHLDL.. .....HLHTP
OLFOR17_40 LLE.APGLQP VVFLVFLFAY LVTVRGNLSI LAAVLEP.. .....KLHTP
GUST27rat ...MILNCN PFSGLFLSMY LVTVLGNLLI ILAVSSNSHL .....HNL
RPE PTGFGLEVL AVGMVLLVEA LSGLSLNTLT IFSFCKTPEL .....RTP
30 HHRF1 FTDVLNQSKP VTFLYGVVF LFGSIGNFLV IFTITWRRRI .....QCS
HHRF2 NSTEIQLEF YTRLGVWLMC IVGTFLNVLV ITTILYRRK K.....KSP
HHRF3 MTGPLFAIRT TEAVLNTFII FVGGPLNAIV LITQLLTNRV LG.....YST
MCP-1A ..DVKQIGAQ LLPLYSLVF IFGFVGNMLV VLILINCKKL .....KCL
MCP-1B ..DVKQIGAQ LLPLYSLVF IFGFVGNMLV VLILINCKKL .....KCL
35 PPR1bovine ..EVRKFAKV FLPAFFTIAF IIGLAGNSTV VAIYAYYKKR .....RTK

```

TM2

```

151 200
GPCRAelegans TRFLMCNLAF ADFILGLYIF ILTSVSAVTR GDYHNYVQQW QNGAGCKILG
40 GRH .KLLLKHLTL ANLLETILVM PLDGMWNITV QWYA.....GELLCKVLS
TRH TNCYLVS LAV ADLMVLVAAG LPNITDSIYG SWVYGYV... ..GCLCIT
FSHprec PRFLMCNLAF ADLCIGIYLL LIASVDIHTK SQYHNYAIDW QTGAGCDAAG
TSHprec PRFLMCNLAF ADFCMGMYLL LIASVDLYTH SEYYNHAIDW QTGPGCNTAG
LH_CGprec PRFLMCNLSF ADFCMGLYLL LIASVDSQTK GQYYNHAIDW QTGSGCSTAG
PGE_EP1 FLLFVASLLA TDLAGHVIP ALVLRLYTA. ....GRA PAGGACHFLG
PGE_EP2 FYTLVCGLAV TDLGTLVVS PVTIATYMKG .....QWPG GQP.LCEYST
45 PGE_EP3 FHVLTVELVF TDLGTLCLIS PVVLASYARN QT..LVALAP ESR.ACTYFA
PGF FLLLASGLVI TDFFGHLING AIAVIFYASD KE..WIRFDQ .SNVLCISIFG
PGI FAVLVTGLAA TDLGTSFSL PAVFVAYARN SS..LLGLAR GGPALCDAFA
TXA2 FLTFLCGLVL TDFLGLLVTG TIVVSQAAL FE..WHAUDP GCR.LCRFMG
PAF ..IFMVNLTM ADMFLFLITL LWIVYYQ.NQ GNWIL.....PK.FLCNVAG
M2 NNYFLFSLAC ADLIIGVFSM NLYTLYTVIG .....YWPL .GPVVCDLWL
50 M4 NNYFLFSLAC ADLIIGAFSM NLYTVYIIGK .....YWPL .GAVVCDLWL
M1 NNYFLLSLAC ADLIIGTFSM NLYTTYLLMG .....HWAL .GTLACDLWL
M3 NNYFLLSLAC ADLIIGVISM NLYTTYIIMN .....RWAL .GNLACDLWL
M5 NNYFLLSLAC ADLIIGIFSM NLYTTYILMG .....RWAL .GSLACDLWL
H1 GNLYIVSLSV ADLIVGAVVM PMNLYLLMS .....KWSL .GRPLCLFWL
H2 TNCFIVSLAI TDLGLGLVL PFSAIYQLSC .....KWSF G.KVFCNIYT
55 5HT1A ANYLIGSLAV TDLMVSVLVL PMAALYQVLN .....KWTL .QGVTCDLFI
5HT1B ANYLIASLAV TDLVSVILVM PISTMYTVTG .....RWTL .GOVVCDFWL
5HT1D ANYLIGSLAT TDLVSVILVM PISIAYTITH .....TWNF .GOILCDIWL

```

ES 2 299 242 T3

	5HT1E	ANYLICSLAV	TDLLVAVLVM	PLSIIYIVMD	RWKL	.GYFLCEVWL
	5HT1F	ANYLICSLAV	TDFLVAVLVM	PFSIVYIVRE	SWIM	.GQVVCIDIWL
	5HT2A	TNYFLMSLAI	ADMLLGFLVM	PVSMILTILYG	YRWPL	P.SKLCAVWI
	5HT2B	TNYFLMSLAV	ADLLVGLFVM	PIALLTIMFE	AMWPL	P.LVLCPAWL
5	5HT2C	TNYFLMSLAI	ADMLVGLLVM	PLSLLAILYD	YVWPL	P.RYLCPVWI
	5HT5A	PHNLVASTAV	SDVLVAALVM	PLSLVHELSE	GRRWQL	.GRRLCQLWI
	5HT5Brat	PHNLVASTAV	SDVLVAALVM	PLSLVSELSA	GRRWQL	.GRSLCHVWI
	5HT6rat	SNFFLVSLFT	SDLVMGLVVM	PPAMLNALYG	RWVL	A.RGLCLLWT
	5HT7	SNYLVSLAL	ADLSVAVAVM	PFVSVTDLIG	G.....KWIF	.GHFFCNVFI
	alpha1A	TNYFIVNLAV	ADLLLSATVL	PFSATMEVLG	FWAF	G.RAFCDVWA
10	alpha1B	TNYFIVNLAM	ADLLLSFTVL	PFSAALEVLG	YWVL	G.RIFCDIWA
	alpha1C	THYYIVNLAV	ADLLLTSTVL	PFSAlFEVLG	YWAF	G.RVFCNIWA
	alpha2A	QNLFLVSLAS	ADILVATLVI	PFSLANEVMG	.Y.....WYF	.GKAWCEIYL
	alpha2B	QNLFLVSLAA	ADILVATLII	PFSLANELLG	.Y.....WYF	R.RTWCEVYL
	alpha2C1	QNLFLVSLAS	ADILVATLVM	PFSLANELMA	.Y.....WYF	.GQVWCGVYL
	alpha2C2	QNLFLVSLAS	ADILVATLVM	PFSLANELMA	.Y.....WYF	.GQVWCGVYL
15	beta1	TNLFIMSILAS	ADLMVGLLVV	PFGATIVVWG	RWEY	GS.FFCELTWT
	beta2	TNYFIVSLAC	ADLMVGLAVV	PFGAAHILMK	MWTF	GN.FWCEFWT
	beta3	TNVFVTSLAA	ADLMVGLLVV	PPAATLALTG	HWPL	GA.TGCELTWT
	beta4turkey	TNVFVTSLAC	ADLMVGLLVV	PPGATILLSG	HWPY	GT.VVCELTWT
	D1A	TNFFVISLAV	SDLLVAVLVM	PWKAVAEIAG	FWPF	GS..FCNIWV
	D2	TNYLIVSLAV	ADLLVATLVM	PWVVYLEVVG	E.....WKF	S.RIHCDFIV
	D3	TNYLVVSLAV	ADLLVATLVM	PWVVYLEVTG	GV.....WNF	S.RICCDVVFV
20	D4	TNSFIVSLAA	ADLLALLVL	ELFVYSEVOG	GA.....WLL	SPRLC.DALM
	D5	TNVFIVSLAV	SDLFVALLVM	PWKAVAEVAG	YWPF	GA..FCDVWV
	A1	TFCFIVSLAV	ADVAVGALVI	PLAILINIGP	QTYFHTCL..	MVA
	A2a	TNYFVVSLLA	ADIAVGVLAI	PFAITISTGF	CAACHGCL..	FIA
	A2b	TNYFLVSLAA	ADVAVGLFAI	PFAITISLGF	CTDFYGCCL..	FLA
	A3	TFYFIVSLAV	ADIAVGVLVI	PLAIVVSLGI	TIHFYSCL..	FMT
25	OCdrome	QNFVIVSLAV	ADLTVALLV	PFNVAYSILG	R.....WEF	GI.HLCKLWL
	ACTH	MYFFICSLAI	SDMLGSLYKI	LENILILLRN	MGYLKPRGSF	ET.TADDIID
	MSH	MYCFICCLAL	SDLLVSGTNV	LETAVILLE	AGALVARAAV	LQ.QLDNVID
	MC3	MYFFLCSLAV	ADMLVSVSNA	LETIMIAIVH	SDDYTFEDQF	IQ.HMDNIFD
	MC4	MYFFICSLAV	ADMLVSVSNG	SETIIITLLN	STD.TDAQSF	TV.NIDNVID
	MC5	MYFFVCSLAV	ADMLVSMSSA	WETITITLLN	NKHLVIADAF	V.RHIDNVFD
30	melatonina	GNIEVVSILAV	ADLVVAIYFY	PLVMSIFMNN	GWNLYGLH..	CQVSG
	oxitocina	LPFFMKHLSI	ADLVVAVFQV	LPQLLWDITF	RFYGP.....	..DLLCRLVK
	conopressinLS	MQWFIAHLAF	ADIFVGFENI	LPQLISDVTI	VFHGDD....	..FTCRFIK
	V1A	MHLFIRHLSL	ADLAVAFFQV	LPQMCWDITY	RFRGPD....	..WLCRVVK
	V1B	MHLFVLHLAL	TDLAVALFQV	LPQLLWDITY	RFQGP.....	..DLLCRAVK
	V2	IHVFIGHLCL	ADLAVALLFQV	LPQLAWKATD	RFRGPD....	..ALCRAVK
35	CKK_A	TNIFLLSLAV	SDMLCCLFCM	PFNLIPNLK	DFIFGS....	..AVCKTTT
	CKK_B	TNAFLLSLAV	SDLLLAVACM	PFTLLPNLMG	TFIFGT....	..VICKAVS
	NPY1	TNIVLVNLSF	SDLLVAIMCL	PFTFVYTLMD	HWVFGF....	..AMCKLNP
	NTR	VHYHLGSLAL	SDLLTLLLAM	PVELYNFIWV	HHPWAF....	..GDAGCRGY
	NK1	TNYFLVNLA	AEASMAAFNT	VVNFTYAVHN	EWYGL....	..FYCKFHN
	NK2	TNYFIVNLAL	ADLCMAAFNA	AFNFVYASHN	IWYFGR....	..AFCYFQN
	NK3	TNYFLVNLA	SDASMAAFNT	LUNFIYALHS	EWYFGA....	..NYCRFQN
40	blueops	LNYILVNVSF	GGFLLCIFSV	FPVFVASCNG	YFVFGF....	..HVCALG
	greenops	LNWILVNLA	ADLAETVIAS	TISVNVQVYG	YFVLGH....	..PMCULEG
	redops	LNWILVNLA	ADLAETVIAS	TISVNVQVSG	YFVLGH....	..PMCULEG
	rodopsina	LNYILVNLA	ADLFMVVGGF	TSTLYTSLHG	YFVFGF....	..TGCNLEG
	violetopsGg	LNYILVNISA	SGFVSCVLSV	FVVFVASARG	YFVFGF....	..KRVCELEA
	opsin_crab	TNLLVNVLA	SDFCMMAFMM	PTMTSNCFAE	TWILG....	..PFMCEVYG
45	ET_Aprec	PNALIASLAL	GDLIYVVIDL	PINVFKLLAG	RWPFDPH.NDF	GV.FLCKLFP
	ET_Bprec	PNILIASLAL	GDLLHIVID	PINVKLLAE	DWPFDAE...	MCKLVP
	ET_Cfrog	PNVLIASLAL	GDLYFILIAI	PIISISFWLS	TGH.....	SEYIYQ
	galanin	TNLFILNLSI	ADLAYLLFCI	PFOATVYALP	TWVLGA....	FICKFIH
	NMB	PNIFISNLAA	GDLLLLLTCV	PVDASRYFFD	EWMPGKVG..	CKLIP
	GRP	PNLFISLAL	GDLLLLLITCA	PVDASRYLAD	RWLEGRIG..	CKLIP
	BRS3	PNIFITSLAF	GDLLLLLTCV	PVDATHYLA	GWLFGRIG..	CKVLS
50	deltaOP	TNIYIFNLAL	ADALATSTLP	FQSAKYLME	.WPFGE....	LLCKAVL
	kappaOP	TNIYIFNLAL	ADALVTITMP	FQSTVYLMNS	.WPFGE....	LVCKIVI
	muOP	TNIYIFNLAL	ADALATSTLP	FQSVNYLMGT	.WPFGE....	ILCKIVI
	OPRX	TNIYIFNLAL	ADTLVLLTLP	FQGTDLILGF	.WPFGE....	ALCKTVI
	CB1	SYHFIGSLAV	ADLLGSVIFV	YSFIDFHVFH	RKD.....	..SRNVFLFKL
	CB2	SYLFIGSLAG	ADFLASVFA	CSFVNHFVFA	GVD.....	..SKAVFLKI
55	SSTR1	TNIYILNLAI	ADELLMLSV	FLVTSTLLRH	.WPFGE....	LLCRLVL

	SSTR2	TNIYILNLAI	ADEFMLGLP	FLAMQVALVH	.WPFGK....	..AICRVVM
	SSTR3	TNVYILNLAL	ADEFMLGLP	FLAAQNALSY	.WPFGS....	..LMCRLVM
	SSTR4	TNIYLLNLAV	ADEFMLSV	FVASSAALRH	.WPFGS....	..FLCRVL
	SSTR5	TNIYILNLAV	ADVLYMLGLP	FLATQNAASF	.WPFGP....	..VLCRLVM
5	IL8A	TDVYLLNLAL	ADLLFALTLP	IWAA..SKVN	GWIFGT....	..FLCKVVS
	IL8B	TDVYLLNLAL	ADLLFALTLP	IWAA..SKVN	GWIFGT....	..FLCKVVS
	AT1a	ASVFLNLAL	ADLCFLLTLP	LWAVYTAMEY	RWPFGN....	..YLCKIAS
	AT1brat	ASVFLNLAL	ADLCFLLTLP	LWAVYTAMEY	RWPFGN....	..HLCKIAS
	AT2	SSIYIFNLAV	ADLLLLATLP	LWATYYSRY	DWLFPG....	..VMCKVFG
	BK1	AEIYLANLAA	SDLVFLGLP	FWAENIWNQF	NWPFGA....	..LLCRVIN
10	BK2	AEIYLGNLAA	ADLLIACGLP	FWAITISNNF	DWLFGE....	..TLCRVIN
	P2Y7	TALMVNLAL	ADLAVLLTAP	FFLHFLAQGT	WSFGLA....	..GCRLCH
	P2Y6	SAVYTLNLAL	ADLLYACSLP	LLIYNYARGD	HWPFGD....	..LACRLVR
	P2Y5	TTYMLNLAI	SDLLFVFTLP	FRIYFVVRN	.WPFGE....	..VLCRISV
	P2Y4	TATYMFHAL	SDTYVVSLLP	TLIYYAAHN	HWPFGT....	..FLCKFVR
	P2Y3chick	TTYMLNLAM	ADLLYVCSLP	LLIYNYTQKD	YWPFGD....	..FTCKFVR
	P2Y2	STTYMFHAL	SDALYAASLP	LLVYYARGD	HWPFGT....	..VLCRISV
15	P2Y1	ISVYMFNLAV	ADFLYVLTLP	ALIFYFNKT	DWIFGD....	..AMCKLQR
	THRprec	AVVYMLHLAT	ADLVFVSLLP	FKISYFSGS	DWQFGS....	..ELCRFVT
	C5a	NAIWFNLAV	ADFLSCLALP	ILFTSIVQHH	WPFGE....	..ACSILP
	GP01mouse	MFLIGSLAL	ADLLAGLGLI	INFVFAVLLQ	SE....	..ATKLVTI
	R334rat	MFLIGSLAL	ADLLAGLGLI	INFVFAVLLQ	SE....	..ATKLVTI
	GP21mouse	MFLVGSAL	ADLLAGLGLV	LHFAADFCIG	SP....	..EMSLMLV
20	GCRcmouse	TSFLVNLAV	ADMITLLNT	PFTLVRFVNS	TWVFGK....	..GMCHVSR
	TXKR	TNSFLVNLAF	ADAAMAALNA	LNVFIYALHG	EWYFGA....	..NYCRFON
	G10Drat	LNLYILNLAV	ADLGIILSLP	VWMLEVMLEY	TWLWGS....	..FSCRFIH
	RDC1	.HCYILNLAI	ADLVVLTIP	VWVSLVQHN	QWPMGE....	..LTCKVTH
	BLR1	.TFLFHAL	ADLLLVFILP	FAVAEGSV..	GWVLGT....	..FLCKTVI
	CL5	LHLSV	ADLLFVITLP	FWAVDAVA..	NWYFGN....	..FLCKAVH
25	LCR1	LHLSV	ADLLFVITLP	FWAVDAVA..	NWYFGN....	..FLCKAVH
	EBI1	LLNLAV	ADILFLLTLP	FWAYSAAK..	SWVFGV....	..HFCKLIF
	RBS1rat	LLNLAL	SDLLFVATLP	FWTHYLIS..	HEGLHN....	..AMCKLTT
	EBI2	STNLVI	SDILFTTALP	TRIAYYAMGF	DWRIGD....	..ALCRITA
	GCRtchick	MLNLAI	SDLLFVFTLP	FRIYFVVRN	NWPFGD....	..VLCRISV
	APJ	.IFIASLAV	ADLTFFVTLTLP	LWATYTYRDY	DWPFGT....	..FFCKLSS
	RTArat	FSIYFLHLAS	ADGIYLFASKA	VIALLNMGTF	LGSFPD....	..YVRRVSR
30	UHRrat	TNFLIGNLAL	SDVLMCAACV	PLTLAYAFEP	RGWVFG....	..GGCLHVP
	FMRL1	NTICYLNAL	ADFSFSAIIP	FRMVSVAMRE	KWPFAS....	..FLCKLVH
	FMRL2	TTICYLNAL	ADFSFTATLP	FLIVSMAMGE	KWPFAG....	..FLCKLIH
	fMLP	TTISYLNAL	ADFCFTSTLP	FFMVRKAMGG	HWPFGW....	..FLCKFLP
	OLF1catfish	KYITVFNAL	SDLCGSSALI	PKLIDTFLF..	ENQV	ISYEACLANM
	OLF3catfish	KYIAVFNAL	SDLCGSSALI	PKLLDMLLF..	ENQS	ISYEACLSNM
35	OLF8catfish	MCILIGLMAV	VDLSMPICFV	PNMLLSFLF..	NWKG	ISLVGCLVQM
	OLF32Acatfish	KYMGIFNLAL	SDFGETNLI	PSLVKTLFF..	DSQY	ISYDACLANM
	OLF32Bcatfish	KYMGIFNLAL	SDFGETNLI	PSLVKTLFF..	DSQY	ISYDACLANM
	OLF32Ccatfish	KYMGIFNLAL	SDFGETNLI	PSLVKTLFF..	DSQY	ISYDACLANM
	OLF32Dcatfish	KYMGIFNLAL	SDFGETNLI	PSLVKTLFF..	DSQY	ISYDACLANM
	OLF47catfish	KFLAVFNAL	VDISINSVII	PQMVPVFVF..	NLNH	ISFESCFSQM
	OLF202catfish	MYIIMNLAL	SDVLFSTTTL	PKIARYWF..	GDGS	ISFVGCIFQM
40	OLFCOR1chicken	MYIFLQNL	TDAAYSTVIT	PKMLATFL..	EERT	ISYVGCILQY
	OLFCOR2chicken	MYIFLQNL	TDAAYSTVIT	PKMLATFL..	EERT	ISYVGCILQY
	OLFCOR3chicken	MYIFLQNL	TDAAYSTVIT	PKMLATFL..	EERT	ISYVGCILQY
	OLFCOR4chicken	MYIFLQNL	TDAAYSTVIT	PKMLATFL..	EERT	ISYVGCILQY
	OLFCOR5chicken	MYIFLQNL	TDAAYSTVIT	PKMLATFL..	EERT	ISYVGCILQY
	OLFCOR6chicken	MYIFLQNL	TDAAYSTVIT	PKMLATFL..	EERT	ISYVGCILQY
45	OLFdog	MYFLSNL	SDLCFSSVTM	PKLLQNMQ..	SQVPS	IPYAGCLTQM
	OLF07E	VYFFLANLSF	TDLFFVTNTI	PKMLVNLQ..	SHNKA	ISYAGCLTQL
	OLF07I	MYFLSNL	SDLCFSSVTI	PKLLQNMQ..	NQDPS	IPYADCLTQM
	OLF07J	MYFFLSNLST	SETVYTLVIL	PRMLSSLV..	GMSQP	MSLAGCATQM
	OLF0R3mouse	MYFFLSNLSS	LDLAFTTSSV	PQMLKNLW..	GPKDT	ISYGGCVTQL
	OLFrat	MYFFLSNL	VDLCYSTVIT	PKMLVNL..	GKKNF	ITYSECMQF
50	OLF3rat	MYFFLSNL	VDICFISTTV	PKMLVNIQ..	TQNNV	ITYAGCITQI
	OLF5rat	MYFFLSNL	VDVCFSSSTTV	PKVLNHI..	LGSQA	ISFSGCLTQL
	OLF6rat	MYFFLSNL	LEIWFTTACV	PKTLATF..	APRGV	ISLAGCATQM
	OLF12rat	MYFFLSNL	VDICFTSTTI	PKMLVNIY..	TQSKS	ITYEDCISQM
	OLF13rat	MYFLSNL	SDLCFSSVTM	PKLLQNM..	SQDTS	IPYGGCLAQT
	OLF17rat	MYFFLANMSF	LEIWFVTVTI	PKMLAGFIG..	SKENHQL	ISFEACMTQL
55	OLF18rat	MYFLSNL	SDLCFSSVTM	LKLLQNIQ..	SQVPS	ISYAGCLTQI
	OLF19rat	MYFLSNL	SDLCFSSVTM	PKLLQNMQ..	SQVPS	IPYAGCLAQI
	OLF114rat	MYFLSNL	SDLCFSSVTM	PKLLQNMQ..	SQVPS	ISYTGCLTQL
60	OLF115rat	MYFLSNL	SDLCFSSVTM	PKLLQNMQ..	SQVPS	IPFAGCLTQL
	OLF0R17_40	MYFFLGNSLV	LDVGCISVTV	PSMLSRLL..	SRKRA	VPCGACLTQL
	GUST27rat	MYFFLSNL	VDICFISTTI	PKMLVNIH..	SOTKD	ISYIECLSQV
	RPE	CHLLVLSLAL	ADSGISLAL	VAATSSLLRR	WPYG.....	..SDGQAHG
	HHRF1	GDVYFINLAA	ADLLFVCTLP	LWMQYLLDHN	SLA.....	..SVPCTLLT
	HHRF2	SDTYICNLAV	ADLLIVVGLP	FFLEYAKHHP	KLSR.....	..EVVCSGLN
	HHRF3	PTIYMTNLYS	TNFLTITVLP	FIVLSNQWLL	PAG.....	..VASCKFLS
65	MCP-1A	TDIYLLNLAI	SDLLFLITLP	LWAHSAANEW	VFG.....	..NAMCKLFT
	MCP-1B	TDIYLLNLAI	SDLLFLITLP	LWAHSAANEW	VFG.....	..NAMCKLFT
	PPR1bovine	TDVYILNLAV	ADFLFLFTLP	FWAVNAVHGW	VLG.....	..KIMCKVTS

Se obtuvieron las secuencias anteriores de una base de datos pública. Se incluyen ejemplos de secuencias de dominios de transmembrana TM3 y TM5 en WO 94/05695 y se incorporan como referencia. Los ejemplos de secuencias de dominios de transmembrana TM4, TM6 y TM7 pueden ser obtenidos de forma similar de fuentes públicas.

5 2. Síntesis de péptidos

Los péptidos o fragmentos de GPCR pueden ser aislados de una fuente natural, químicamente sintetizados o producidos recombinantemente, para obtener polipéptidos GPCR que imitan, modulan o inhiben la unión de ligandos a receptores copulados a proteína G.

10

a. Síntesis química de péptidos de transmembrana GPCR

Los péptidos de transmembrana de la presente invención son producidos usando procedimientos bien conocidos de síntesis peptídica, como se describe en, v.g., Merrifield, Science 232: 341-347 (1986), Barany y Merrifield, THE PEPTIDES, Gross y Meienhofer, eds. (N.Y., Academic Press), pp. 1-284 (1979); y Stewart y Young, SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS (Rockford, Ill., Pierce), 2ª Ed. (1984), aquí incorporados como referencia.

15

Los péptidos fueron sintetizados por una síntesis peptídica en fase sólida de flujo a través en un Sintetizador Peptídico de Applied Biosystems 432A utilizando derivados Fmoc de aminoácidos. Para vencer la agregación que frecuentemente aparece durante la síntesis de péptidos hidrofóbicos y da lugar al bloqueo de la cadena peptídica en crecimiento, se introdujeron derivados FmocHmb de Ala, Val y Leu en las diferentes secuencias, pero no más de dos derivados de cada tipo por péptido para evitar el bloqueo estérico durante la síntesis. Se prolongó la copulación en la etapa después del aminoácido FmocHmb a 90 min., ya que este grupo protector provoca un enlentecimiento de la siguiente etapa de copulación debido a bloqueo estérico (T. Johnson, M. Quibell, Tetrahedron Lett. 35:463 (1994)). La pureza de los péptidos fue valorada por HPLC de fase invertida y las estructuras fueron confirmadas por espectrometría de masas con desorción de láser asistida por matriz.

25

b. Producción recombinante de péptidos de transmembrana GPCR

Se pueden obtener ácidos nucleicos que codifican péptidos de transmembrana GPCR por sintetización, aislamiento u obtención de una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína GPCR y subclonación de una región de la secuencia que codifica un péptido de transmembrana deseado.

30

i. Síntesis química de oligonucleótidos

35

Los oligonucleótidos usados en la presente invención, incluyendo secuencias que codifican péptidos de transmembrana, son eventualmente sintetizados químicamente usando el método de triéster de fosforamidita en fase sólida de Beaucage y Carruthers, Tetrahedron Lett., 22(20): 1859-1862 (1981), usando un sintetizador automatizado como se describe en Needham-VanDevanter y col., Nucleic Acids Res., 12: 6159-6168 (1984). Se purifican entonces los oligonucleótidos químicamente sintetizados por electroforesis en gel de acrilamida nativa o por HPLC de intercambio aniónico como se describe en Pearson y Regnier, J. Chrom., 255: 137-149 (1983). Se verifica la secuencia del oligonucleótido sintético, por ejemplo usando el método de degradación química de Maxam y Gilbert en Grossman, L. y Moldave, D., eds. Academic Press, New York, Methods in Enzymology, 65:499-560 (1980).

40

Se pueden modificar (es decir, mutar) las secuencias de ADN codificantes de los péptidos y proteínas de transmembrana GPCR para preparar diversas mutaciones. Dichas mutaciones pueden ser degenerativas, es decir, que la mutación no cambia la secuencia de aminoácidos codificada por el codon mutado, o no degenerativas, es decir, que la mutación cambia la secuencia de aminoácidos codificada por el codon mutado. Estas secuencias de ADN modificadas pueden ser preparadas, por ejemplo, mutando secuencias conocidas de tal forma que la mutación dé lugar a la delección, sustitución, inserción, inversión o adición de uno o más aminoácidos en el polipéptido codificado usando diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden emplear los métodos de mutagénesis dirigida a sitio descritos en Taylor y col., Nucl. Acids Res. 13, 8749-8764 (1985), y Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 482-492 (1985). Además, se pueden comprar kits para mutagénesis dirigida a sitio a vendedores comerciales. Por ejemplo, se puede comprar un kit para realizar mutagénesis dirigida a sitio a Amersham Corp. (Arlington Heights, Ill.). Tanto las mutaciones degenerativas como las no degenerativas pueden ser ventajosas en la producción o el uso de los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, estas mutaciones pueden permitir mayores niveles de producción o una más fácil purificación, o proporcionar sitios adicionales de reconocimiento de endonucleasas de restricción. Todos estos ADN modificados (y las moléculas polipeptídicas codificadas) están incluidos en el alcance de la presente invención.

45

50

55

60 ii. Aislamiento recombinante de ácidos nucleicos codificantes de péptidos de transmembrana GPCR

Se pueden aislar ácidos nucleicos que codifican GPCR a partir de librerías genómicas o de ADNc, subclonando la librería en vectores de expresión, marcando sondas, hibridación de ADN y similares, como se describe en Sambrook, y col., MOLECULAR CLONING - A LABORATORY MANUAL (2ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Se hace aquí referencia en adelante a este manual como "Sambrook y col." y se incorpora aquí como referencia.

65

También se pueden usar varios métodos de amplificación de secuencias de interés, tales como la reacción en cadena de polimerasa (PCR), para preparar ADN codificante de péptidos de transmembrana GPCR o de un fragmento peptídico de los mismos. En las técnicas de PCR, se sintetizan cebadores oligonucleotídicos complementarios a los dos extremos 3' de la región de ADN que se ha de amplificar. Se lleva a cabo entonces la reacción en cadena de polimerasa usando dos cebadores. Véase PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS. (Innis, M, Gelfand, D., Sninsky, J. y White, T., eds.), Academic Press, San Diego (1990). Se pueden seleccionar cebadores para amplificar la totalidad de las regiones codificantes de un péptido de transmembrana GPCR de longitud completa o para amplificar segmentos de ADN de menor tamaño, según se desee. Una vez se amplifican por PCR las secuencias seleccionadas, se pueden preparar sondas oligonucleotídicas a partir de la secuencia obtenida. Se pueden usar luego estas sondas para aislar ADN codificantes de péptidos de transmembrana GPCR o de un fragmento peptídico de los mismos.

iii. *Expresión recombinante de ácidos nucleicos codificantes de péptidos de transmembrana*

Una vez se aísla y clona un ácido nucleico codificante de un péptido de transmembrana GPCR o de un fragmento peptídico del mismo, el ácido nucleico es expresado en una variedad de células sometidas a ingeniería recombinante para determinar que el ácido nucleico aislado realmente codifica los péptidos de transmembrana GPCR deseados o un fragmento de los mismos. Se consigue típicamente la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos uniendo operativamente un ácido nucleico de interés a un promotor (que es constitutivo o inducible), incorporando la construcción a un vector de expresión e introduciendo el vector en una célula huésped adecuada. Los vectores típicos contienen finalizadores de la transcripción y de la traducción, secuencias de iniciación de la transcripción y de la traducción y promotores útiles para la regulación de la expresión del ácido nucleico particular. Los vectores incluyen eventualmente cassettes de expresión genéricos que contienen al menos una secuencia finalizadora independiente, secuencias que permiten la replicación del cassette en eucariotas o procariotas o ambos (v.g., vectores lanzadera) y marcadores de selección para sistemas tanto procarióticos como eucarióticos. Los vectores son adecuados para replicación e integración en procariotas, eucariotas o preferiblemente ambos. Véanse Gilman y Smith (1979), *Gene*, 8: 81-97; Roberts y col., (1987), *Nature*, 328:731-734; Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology* 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook y col., (1989), *MOLECULAR CLONING - A LABORATORY MANUAL* (2ª ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (Sambrook); y F.M. Ausubel y col., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (Suplemento de 1994) (Ausubel). La información del producto de fabricantes de reactivos biológicos y equipo experimental también proporciona información útil sobre métodos biológicos conocidos. Dichos fabricantes incluyen la compañía química SIGMA (Saint Louis, MO), R&D Systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem. Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza) y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como otras muchas fuentes comerciales conocidas para un experto.

Los ácidos nucleicos (v.g., secuencias codificantes, promotores y vectores) usados en el presente método pueden ser aislados de fuentes naturales, obtenidos de fuentes tales como librerías ATCC o GenBank o preparados por métodos sintéticos. Los ácidos nucleicos sintéticos pueden ser preparados por una variedad de métodos en solución o en fase sólida. Hay una amplia disponibilidad de descripciones detalladas de los procedimientos para la síntesis en fase sólida de ácidos nucleicos por química de fosfitos-triésteres, fosfotriésteres y H-fosfonatos. Véanse, por ejemplo, Itakura, Patente EE.UU. N° 4.401.796; Caruthers y col., Patentes EE.UU. N° 4.458.066 y 4.500.707; Beaucage y col. (1981), *Tetrahedron Lett.*, 22:1859-1862; Matteucci (1981) y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 103:3185-3191; Caruthers, y col. (1982), *Genetic Engineering*, 4:1-17; Jones, capítulo 2, Atkinson y col., capítulo 3, y Sproat y col., capítulo 4, en *OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS: A PRACTICAL APPROACH*, Gait (ed.), IRL Press, Washington D.C. (1984); Froehler y col. (1986), *Tetrahedron Lett.*, 27:469-472; Froehler y col. (1986), *Nucleic Acids Res.*, 14:5399-5407; Sinha y col. (1983), *Tetrahedron Lett.*, 24:5843-5846; y Sinha y col. (1984), *Nucl. Acids Res.*, 12:4539-4557, aquí incorporadas como referencia.

3. *Péptidos y peptidomiméticos derivatizados*

Es bien conocido el diseño de péptidos y miméticos de péptidos químicamente modificados que son resistentes a la degradación por enzimas proteolíticas o tienen una mejor solubilidad o propiedades de unión.

Los aminoácidos modificados o derivados químicos de péptidos GPCR según la presente invención pueden contener restos químicos adicionales o aminoácidos modificados que normalmente no forman parte de una proteína. Se incluyen así modificaciones covalentes del péptido en el alcance de la presente invención. Dichas modificaciones pueden ser introducidas en un polipéptido GPCR por reacción de residuos de aminoácidos deseados del polipéptido con un agente derivatizante orgánico capaz de reaccionar con cadenas laterales o residuos terminales seleccionados. Los siguientes ejemplos de derivados químicos son facilitados a modo de ilustración y no a modo de limitación.

El diseño de miméticos de péptidos resistentes a la degradación por enzimas proteolíticas es bien conocido, tanto para el diseño de agonistas/antagonistas de hormonas como para el de inhibidores enzimáticos. Véanse, v.g., Sawyer, en *STRUCTURE-BASED DRUG DESIGN*, P. Verapandia, Ed., NY 1997; Patente EE.UU. N° 5.552.534; y Patente EE.UU. N° 5.550.251, todas ellas incorporadas como referencia.

Históricamente, el foco principal del diseño de peptidomiméticos ha evolucionado a partir de la investigación para el descubrimiento de fármacos dirigidos a receptores y no ha sufrido un impacto directo de una estructura tridimensional experimentalmente determinada de la proteína de interés. No obstante, una aproximación jerárquica de diseño molecular péptido→peptidomimético y modificación química ha evolucionado a lo largo de las dos últimas décadas, en base a la transformación sistemática de un ligando peptídico y al análisis iterativo de las relaciones estructura-actividad y estructura-conformación de análogos de “segunda generación”. Dicho trabajo ha integrado típicamente técnicas biofísicas (cristalografía de rayos x y/o espectroscopía de RMN) y modelación molecular asistida por ordenador con pruebas biológicas para avanzar el diseño de fármacos peptidomiméticos.

Las propiedades de estructura tridimensional de péptidos se definen en términos de ángulos de torsión (ψ , ϕ , ω , χ) entre el nitrógeno de la amina del esqueleto (N^α), el carbono del carbonilo del esqueleto (C^1), el carbono de la metionina del esqueleto (C^α) y la funcionalización del hidrocarburo de cadena lateral (v.g., C^β , C^1 , C^δ , C^ϵ de Lys) derivado de la secuencia de aminoácidos. Un gráfico de Ramachandran (ψ frente a ϕ) puede definir las combinaciones preferidas de ángulos de torsión para estructuras secundarias ordenadas (conformaciones), tales como la α -hélice, el giro β , el giro γ o la lámina β . La flexibilidad molecular está directamente relacionada con interacciones de unión covalente y/o no covalente en un péptido particular. Incluso modificaciones químicas modestas por N^α -metilo, C^α -metilo o C^β -metilo pueden tener consecuencias significativas sobre la conformación resultante.

El andamiaje N^α - C^α - C' puede ser transformado por introducción de sustitución de olefina (v.g., C^α - $C^\beta \rightarrow C=C$ o deshidroaminoácido o por inserción (v.g., C^α - $C' \rightarrow C^\alpha$ - $C=C$ - C' o aminoácido vinílico). También se puede sustituir el carbono C^β para avanzar el diseño de así llamados aminoácidos “quiméricos”. Finalmente, con respecto a amidas N-sustituidas, merece también la pena mencionar la interesante aproximación de sustituir el andamiaje tradicional del péptido por bloques de construcción de glicina N-sustituida. Globalmente, dichas modificaciones del andamiaje N^α - C^α - C o de la cadena lateral C^α - C^β expanden la diversidad molecular basada en péptidos (es decir, así llamadas librerías “de peptoides”), así como nuestro conocimiento estructural 3-D del espacio ϕ - Ψ - χ tradicional.

En una aproximación, tal como describen Sherman y Spatola, J. Am. Chem. Soc. 112: 433 (1990), se substituyen uno o más enlaces amida en de un modo esencialmente isostérico por una variedad de grupos químicos funcionales. Por ejemplo, se puede substituir cualquier unión amida en cualquiera de los polipéptidos GPCR por un resto de cetometileno, v.g. $(-C(=O)-CH_2-)$ para $(-C(=O)-NH-)$. Unas cuantas de las sustituciones de enlaces amida conocidas incluyen: aminometileno o $\psi[CH_2NH]$; cetometileno o $\psi[COCH_2]$; etileno o $\psi[CH_2CH_2]$; olefina o $\psi[CH=CH]$; éter o $\psi[CH_2O]$; tioéter o $\psi[CH_2S]$; tetrazol o $\psi[CN_4]$; tiazol o $\psi[thz]$; retroamida o $\psi[NHCO]$; tioamida o $\psi[CSNH]$; y éster o $\psi[CO_2]$. Estos substitutos de enlaces amida alteran las propiedades conformacionales y de uniones de H que pueden ser necesarias para el reconocimiento molecular peptídico y/o la actividad biológica en blancos de receptores. Más aún, dichas sustituciones en el esqueleto pueden impartir estabilidad metabólica hacia la escisión con peptidasas en relación al péptido parental. El descubrimiento de aún otro isótero de enlaces amida no hidrolizable ha tenido un impacto particular en el diseño de inhibidores de proteasas y éstos incluyen: hidroximetileno o $\psi[CH(OH)]$; hidroxietileno o $\psi[CH(OH)CH_2]$ y $\psi[CH_2CH(OH)]$; dihidroxietileno o $\psi[CH(OH)CH(OH)]$, hidroxietilamina o $\psi[CH(OH)CH_2N]$, dihidroxietileno e hidroximetileno simétrico C_2 . Dichas modificaciones en el esqueleto han resultado extremadamente efectivas, ya que pueden representar miméticos de estado de transición o bioisósteres del intermediario tetraédrico hipotético (v.g., $\psi[C(OH)_2NH]$) para esta clase de enzimas proteolíticas. Se espera que dichos derivados tengan la propiedad de una mayor estabilidad a la degradación enzimática y que, por lo tanto, posean ventajas para la formulación de compuestos que pueden tener mayores vidas medias *in vivo*, al ser administrados por vía oral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, tópica, rectal, intraocular u otras vías.

Tanto las modificaciones en el esqueleto peptídico como en la cadena lateral pueden proporcionar extremos prototípicos para el diseño de miméticos de estructura secundaria, como sugiere típicamente el hecho de que la sustitución de D-aminoácidos, N^α -Me-aminoácidos, C^α -Me-aminoácidos y/o deshidroaminoácidos en un extremo peptídico puede inducir o estabilizar conformaciones regioespecíficas de giro β , giro γ , lámina β o α -hélice. Hasta la fecha, se han diseñado una variedad de miméticos de estructura secundaria y se incorporado a péptidos o peptidomiméticos. El giro β ha tenido un interés particular en el área del descubrimiento de fármacos peptidomiméticos dirigidos a receptores. Esta unidad estructural secundaria existe en una secuencia tetrapeptídica en la cual el primer y cuarto átomo de C^α están separados en ≤ 7 Å y se caracterizan además por aparecer en una región no helicoidal de la secuencia peptídica y poseer un enlace de H intramolecular de diez miembros entre los residuos de aminoácidos i y $i+4$. Una de las aproximaciones iniciales de significación para el diseño de miméticos de giro β era la plantilla basada en dipéptidos monocíclica que emplea una restricción de cadena lateral a esqueleto en los sitios $i+1$ e $i+2$. A lo largo de la pasada década, se han desarrollado una variedad de otras plantillas monocíclicas o bicíclicas como miméticos de giro β . Se han descrito miméticos de giro β monocíclicos que ilustran la oportunidad potencial para diseñar andamiajes que pueden incorporar cada una de las cadenas laterales (posiciones i , $i+1$, $i+2$ e $i+3$), así como cinco de las ocho funcionalidades NH o C=O, en la secuencia tetrapeptídica parental, secuencia tetrapeptídica modelada en conformaciones de giro β de tipos I-IV. De forma similar, una plantilla de benzodiazepina ha mostrado utilidad como andamiaje de mimético de giro β que también puede estar multisustituido para simular funcionalización de cadena lateral, particularmente en las posiciones i e $i+3$ de la secuencia tetrapeptídica correspondiente modelada en conformaciones de giro β de tipo I-VI. Un mimético de giro γ recientemente descrito ilustra una aproximación innovadora para incorporar un substituto de retroamida entre los residuos de aminoácidos i e $i+1$ con un puente de etileno entre los átomos N^1 (es decir, nitrógeno que substituye al C' del carbonilo) y N de las posiciones i e $i+2$, y esta plantilla permite la posibilidad de las tres cadenas laterales de la secuencia tripeptídica parental. Finalmente, el diseño de un mimético de lámina β proporciona una plantilla atractiva para restringir el esqueleto de un péptido al que simula una conformación

extendida. La lámina β es de interés particular en el área del descubrimiento de fármacos peptidomiméticos dirigidos a proteasas.

Los aminoácidos aromáticos pueden estar substituidos con D- o L-naftilalanina, D- o L-fenilglicina, D- o L-2-tienilalanina, D- o L-1-, 2-, 3- o 4-pirenilalanina, D- o L-3-tienilalanina, D- o L-(2-piridinil)alanina, D- o L-(3-piridinil)alanina, D- o L-(2-pirazinil)-alanina, D- o L-(4-isopropil)fenilglicina, D-(trifluoro-metil)fenilglicina, D-(trifluorometil)fenilalanina, D-p-fluorofenilalanina, D- o L-p-bifenilfenilalanina, D- o L-p-metoxibifenilfenilalanina, D- o L-2-indol(alquil)alaninas y D- o L-alquilaininas, donde el alquilo puede ser metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, pentilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, isopentilo o aminoácidos no ácidos de C_1 - C_{20} substituidos o sin substituir.

Los aminoácidos ácidos pueden estar substituidos con aminoácidos no carboxilados, manteniendo aún una carga negativa, y derivados o análogos de los mismos, tales como los ejemplos no limitativos de (fosfono)alanina, glicina, leucina, isoleucina, treonina o serina; o sulfatados (v.g., $-\text{SO}_3\text{H}$), como treonina, serina o tirosina.

Otras substituciones pueden incluir aminoácidos hidroxilados no naturales producidos combinando "alquilo" (según se define aquí y ejemplifica) con cualquier aminoácido natural. Los aminoácidos básicos pueden estar substituidos con grupos alquilo en cualquier posición de los aminoácidos naturales lisina, arginina, ornitina, citrulina o ácido (guanidino)acético, u otros ácidos (guanidino)alquilacéticos, donde "alquilo" se define como antes. Los derivados de nitrilo (v.g., que contienen el resto CN en lugar de COOH) pueden también substituir a la asparragina o a la glutamina y el sulfóxido de metionina puede substituir a la metionina. Los métodos de preparación de dichos derivados peptídicos son bien conocidos para un experto en la técnica.

Además, cualquier aminoácido de dichos péptidos puede estar substituido por el mismo aminoácido, pero de quiralidad opuesta. Así, cualquier aminoácido natural en la configuración L (a la que también puede hacerse referencia como R o S, dependiendo de la estructura de la entidad química) puede estar substituido con un aminoácido del mismo tipo estructural químico, pero de "caroleo" opuesto, al que generalmente se hace referencia como aminoácido D, pero al que se puede hacer adicionalmente referencia como R o S, dependiendo de su composición y configuración química. Dichos derivados tienen la propiedad de una estabilidad mucho mayor a la degradación enzimática y, por lo tanto, son ventajosos en la formulación de compuestos que pueden tener vidas medias *in vivo* más prolongadas, cuando se administran por vía oral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, tópica, rectal, intraocular u otras.

Como modificaciones de aminoácidos adicionales de aminoácidos de polipéptidos GPCR de la presente invención, se pueden incluir los siguientes: pueden reaccionar residuos de cisteína con alfa-haloacetatos (y correspondientes aminas), tales como ácido 2-cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados carboximetílicos o carboxiamidometílicos. También se pueden derivatizar residuos de cisteinilo por reacción con compuestos tales como bromotrifluoroacetona, ácido alfa-bromo-beta-(5-imidozoi)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil-2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Se pueden derivatizar los residuos de histidilo por reacción con compuestos tales como procarbonato de dietilo, v.g., a pH 5,5-7,0, ya que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo, y también se puede usar bromuro de para-bromofenacilo; v.g., cuando la reacción es preferiblemente llevada a cabo en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0.

Los residuos terminales de lisinilo y amino pueden reaccionar con compuestos tales como anhídrido de ácido succínico u otros anhídridos de ácidos carboxílicos. Se espera que la derivatización con estos agentes tenga un efecto de reversión de la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen alfa-amino incluyen compuestos tales como imidoésteres, v.g., como picolinimidato de metilo, piridoxal fosfato, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobencenosulfónico, O-metilisourea, 2,4 pentanodiona y la reacción catalizada con transaminasas con glioxilato.

Los residuos de arginilo pueden ser modificados por reacción con uno o más reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina según etapas de método conocidas. La derivatización de los residuos de arginina requiere llevar a cabo la reacción en condiciones alcalinas debido al alto pKa del grupo funcional guanidina. Más aún, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de la lisina, así como con el grupo épsilon-amino de la arginina.

Los residuos de tirosilo pueden ser modificados por reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Se pueden usar N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies O-acetiltirosilo y 3-nitroderivados, respectivamente.

Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) pueden ser selectivamente modificados por reacción con carbodiimidas ($\text{R}'\text{-NC-N-R}'$) tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil(4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Más aún, los residuos de aspartilo y glutamilo pueden convertirse en residuos de asparraginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio.

Los residuos de glutaminilo y asparraginilo pueden ser desamidados a los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo. Alternativamente, estos residuos pueden ser desamidados en condiciones débilmente ácidas. Cualquier forma de estos residuos entra dentro del alcance de la presente invención.

La derivatización con agentes bifuncionales es útil para el entrecruzamiento del péptido con ciertos restos químicos. Como agentes entrecruzantes comúnmente usados, se incluyen, v.g., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato) y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes derivatizantes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato dan intermediarios fotoactivables capaces de formar entrecruzamientos en presencia de luz. Alternativamente, se pueden usar matrices insolubles en agua, tales como carbohidratos activados con bromuro de cianógeno y los substratos reactivos descritos en las Patentes EE.UU. N° 3.969.287, 3.691.016, 4.195.128, 4.247.642, 4.229.537 y 4.330.440 (aquí incorporadas en su totalidad como referencia), para la inmovilización de proteínas.

Otras modificaciones de los polipéptidos GPCR de la presente invención pueden incluir la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de los grupos hidroxilo de los residuos serilo o treonilo, la metilación de los grupos alfa-amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecule Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), la acetilación de la amina N-terminal, la metilación de los residuos de amida de la cadena principal (o substitución con N-metilaminoácidos) y, en algunos casos, la amidación de los grupos carboxilo C-terminales, según etapas de método conocidas.

Dichos restos derivatizados pueden mejorar la solubilidad, la absorción, la permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica, la vida media biológica y similares. Dichos restos o modificaciones de los polipéptidos GPCR pueden eliminar o atenuar alternativamente cualquier posible efecto colateral no deseable de la proteína y similares. Se describen restos capaces de mediar en dichos efectos, por ejemplo, en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1980).

Dichos derivados químicos de los polipéptidos GPCR pueden proporcionar también unión a soportes sólidos, incluyendo, aunque sin limitación, agarosa, celulosa, fibras huecas u otros carbohidratos poliméricos tales como agarosa y celulosa, tal como para la purificación, la generación de anticuerpos o la clonación; o para obtener propiedades físicas alteradas, tales como resistencia a la degradación enzimática o una mayor afinidad de unión o modulación para los GPCR, que se desea para composiciones terapéuticas que contengan polipéptidos GPCR, anticuerpos para los mismos o fragmentos de éstos. Dichos derivados peptídicos son bien conocidos en la técnica, así como las etapas de los métodos para producir dichos derivados usando carbodiimidas, ésteres activos de N-hidroxisuccinimida o anhídridos mixtos, como ejemplos no limitativos.

La variación sobre las secuencias de polipéptidos GPCR de la presente invención puede incluir también: la adición de uno o más (v.g., dos, tres, cuatro o cinco) residuos de lisina, arginina u otros residuos básicos o uno o más (v.g., dos, tres, cuatro o cinco) residuos de glutamato o aspartato u otros residuos ácidos en un extremo del péptido, donde "ácido" y "básico" son como aquí se define. Se pueden introducir también cargas negativas por adición de grupos carboxilo, fosfato, borato, sulfonato o sulfato. Dichas modificaciones pueden aumentar el contenido en alfa-hélice del péptido por el "efecto dipolo de la hélice". También pueden aportar una mayor solubilidad acuosa del péptido y permitir la correcta inserción de péptidos en una estructura de membrana.

En otra aproximación, se han usado una variedad de aminoácidos no codificados o modificados tales como D-aminoácidos y N-metilaminoácidos para modificar péptidos de mamíferos. Alternativamente, se ha estabilizado una presunta conformación bioactiva por medio de una modificación covalente, tal como ciclación, o por incorporación de gamma-lactama o de otros tipos de puentes. Véanse, v.g., Veber y Hirschmann, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978 75 2636, y Thorsett, y col., *Biochem Biophys. Res. Comm.*, 1983 111 166. El objetivo primario de tales manipulaciones no ha sido evitar el metabolismo o aumentar la biodisponibilidad oral, sino más bien restringir una conformación bioactiva para aumentar la potencia o para inducir una mayor especificidad para un subtipo de receptor.

Los anteriores ejemplos de agonistas o antagonistas peptidomiméticos basados en andamiaje peptídico o plantilla no peptídica ilustran diversas estrategias para elaborar modelos de conformación bioactiva y/o de farmacóforos de ligandos peptídicos en sus receptores. En muchos casos, también se ha conseguido selectividad de los subtipos de receptores por modificaciones estructurales sistemáticas de extremos prototípicos de peptidomiméticos. Así, aunque las estructuras 3D de los GPCR siguen siendo difíciles de encontrar (excepto para modelos construidos a partir de estructuras 3D de baja resolución basadas en homología de bacteriorrodopsina o rodopsina, véase lo que antecede), el desarrollo de modelos de farmacóforos utilizando la aproximación jerárquica en el diseño de fármacos basado en la estructura de péptidos → peptidomiméticos es prometedor.

4. Purificación de péptidos de transmembrana GPCR

Los polipéptidos de esta invención pueden ser purificados hasta una pureza substancial por técnicas estándar, incluyendo la precipitación selectiva con sustancias tales como sulfato de amonio, la cromatografía en columna, los métodos de inmunopurificación y otros. Véase, por ejemplo, R. Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag: New York (1982), aquí incorporado como referencia. Por ejemplo, los péptidos y proteínas de transmembrana GPCR y los polipéptidos producidos por tecnología de ADN recombinante son purificados por una combinación de lisis celular (v.g., sonicación) y cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación con un anticuerpo específico para péptidos de transmembrana GPCR o un fragmento peptídico de éstos. Para los productos de fusión, la digestión posterior de la proteína de fusión con una enzima proteolítica apropiada libera el polipéptido deseado. Las proteínas pueden ser entonces además purificadas por técnicas de química proteica estándar. Una proteína purifica-

da exhibe preferiblemente una sola banda en un gel electroforético. Se recuerda a los expertos en la técnica que los métodos deben tener en cuenta la naturaleza hidrofóbica de los péptidos.

5. Detección de productos génicos de péptidos de transmembrana GPCR

Los péptidos de transmembrana GPCR o un fragmento peptídico de los mismos pueden ser detectados o cuantificados por una variedad de métodos. Los métodos preferidos incluyen el uso de anticuerpos específicos.

a. Detección de péptidos de transmembrana GPCR por inmunoensayo

i. Producción de anticuerpos

Los métodos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales son conocidos para los expertos en la técnica. Véanse, v.g., Coligan (1991), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; y Harlow and Lane (1989), ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Press, NY; Stites y col., (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (4ª ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y las referencias allí citadas; Goding (1986), MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2ª ed.) Academic Press, New York, NY; y Kohler y Milstein (1975), Nature, 256:495-497. Dichas técnicas incluyen la preparación de anticuerpos por selección de anticuerpos a partir de librerías de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares. Véanse Huse y col., (1989), Science, 246:1275-1281; y Ward y col. (1989) Nature, 341:544-546. Por ejemplo, para producir antisueros para uso como inmunoensayo, se aísla un polipéptido como se describe aquí. Por ejemplo, se produce proteína recombinante en una línea celular transformada. Se inmuniza una cepa endogámica de ratones o conejos con el péptido usando un adyuvante estándar, tal como adyuvante de Freund, y un protocolo de inmunización estándar. Alternativamente, se puede usar un péptido sintético derivado de las secuencias aquí descritas y conjugado a una proteína de soporte como inmunógeno.

Se pueden usar una serie de inmunógenos para producir anticuerpos específicamente reactivos con péptidos de transmembrana GPCR o con un fragmento peptídico de los mismos. La proteína recombinante es el inmunógeno preferido para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales. También se puede usar proteína natural en forma pura o impura. También se pueden usar péptidos sintéticos producidos usando los péptidos de transmembrana GPCR o un fragmento peptídico de los mismos de las secuencias aquí descritas como inmunógeno para la producción de anticuerpos para la proteína. La proteína recombinante puede expresarse en células eucarióticas o procarióticas, como se ha descrito anteriormente, y ser purificada como se ha descrito antes en general. El producto es entonces inyectado en un animal capaz de producir anticuerpos. Se pueden generar anticuerpos monoclonales o policlonales para posterior uso en inmunoensayos para medir la proteína.

Los métodos de producción de anticuerpos policlonales son conocidos para los expertos en la técnica. Resumiendo, se mezcla un inmunógeno, preferiblemente una proteína purificada tal como péptidos de transmembrana GPCR o un fragmento peptídico de los mismos, con un adyuvante y se inyecta en un animal de elección (v.g., un ratón, una rata, un conejo, un cerdo, una cabra, una vaca, un caballo, pollos, etc.) a intervalos de 1-4 semanas. Se puede conjugar el inmunógeno a una proteína de soporte y puede servir de inmunógeno. Se monitoriza la respuesta inmune del animal a la preparación de inmunógeno tomando muestras de ensayo de sangre y determinando el título de reactividad con los péptidos de transmembrana GPCR o un fragmento peptídico de éstos. Cuando se obtienen títulos apropiadamente altos de anticuerpo para el inmunógeno, se recoge sangre del animal y se preparan antisueros. Se puede hacer aún una fraccionación de los antisueros para enriquecer en anticuerpos reactivos con la proteína si se desea. (Véase Harlow y Lane, antes citado).

Se recogen los sueros policlonales y se titulan frente a la proteína inmunogénica en un inmunoensayo, por ejemplo un inmunoensayo en fase sólida con el inmunógeno inmovilizado sobre un soporte sólido. Se seleccionan los antisueros policlonales con un título de 10^4 o superior y se comprueba su reactividad cruzada frente a péptidos de transmembrana no-GPCR o incluso péptidos de transmembrana GPCR de otros tipos celulares u otras especies o un fragmento peptídico de los mismos, usando un inmunoensayo de unión competitiva (véase, v.g., Harlow y Lane, antes citado, en las páginas 570-573). Los anticuerpos y antisueros monoclonales y policlonales específicos normalmente se unirán con una K_D de al menos aproximadamente 0,1 mM, más normalmente de al menos aproximadamente 1 μ M, preferiblemente de al menos aproximadamente 0,1 μ M o mayor, y más preferiblemente de 0,01 μ M o mayor.

Se pueden obtener anticuerpos monoclonales por diversas técnicas con las que los expertos en este campo están familiarizados. Resumiendo, se immortalizan células de bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado, comúnmente por fusión con una célula de mieloma (véase Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519 (1976), aquí incorporado como referencia). Como métodos alternativos de immortalización, se incluyen la transformación con Virus Epstein Barr, oncogenes o retrovirus, u otros métodos bien conocidos en la técnica. Se hace un rastreo de colonias que surgen de células immortalizadas simples en cuanto a la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseadas para el antígeno y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por dichas células puede aumentar gracias a varias técnicas, incluyendo la inyección en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado. Alternativamente, se pueden aislar secuencias de ADN que codifiquen un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo rastreando una librería de ADN de células B humanas según el protocolo general señalado por Huse y col., (1989) Science 246:1275-1281.

ii. *Inmunoensayos*

Se puede medir una proteína particular por una variedad de métodos de inmunoensayo. Para una revisión de procedimientos inmunológicos y de inmunoensayo en general, véase BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY, 7ª Edición (D. Stites y A. Terr, eds.) 1991. Más aún, los inmunoensayos de la presente invención pueden ser llevados a cabo en cualquiera de varias configuraciones, que están ampliamente revisadas en ENZYME IMMUNOASSAY, E.T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida (1980); "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, en LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam (1985); y Harlow y Lane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, antes citado, cada una de las cuales es aquí incorporada como referencia.

Los inmunoensayos para péptidos o peptidomiméticos de transmembrana GPCR o subfragmentos de los mismos pueden usar un antisuero policlonal producido contra un péptido o peptidomimético de la invención. Este antisuero es seleccionado para tener una baja reactividad cruzada frente a otros péptidos (distintos de los péptidos de transmembrana no-GPCR u otros péptidos de transmembrana GPCR) y cualquier reactividad cruzada de este tipo es eliminada por inmunoabsorción antes de su uso en el inmunoensayo.

Se pueden usar inmunoensayos en el formato de unión competitiva para las determinaciones de reactividad cruzada. Por ejemplo, se puede inmovilizar un antígeno peptídico de referencia de la invención en un soporte sólido. Se mide la capacidad de otras moléculas (distintas de los péptidos de transmembrana no-GPCR, o desconocidas) para competir con la unión de antisueros que reconocen el antígeno peptídico de referencia inmovilizado. Se compara la capacidad de tales moléculas para competir con la unión de un antisuero o anticuerpo al péptido de referencia inmovilizado con una molécula estándar, tal como el propio antígeno peptídico de referencia. Se calcula el porcentaje de reactividad cruzada usando cálculos estándar. Se seleccionan antisueros con menos de un 10% de reactividad cruzada para moléculas que tienen reactividad cruzada y se reúnen. Se elimina eventualmente cualquier anticuerpo que tenga reactividad cruzada de los sueros reunidos por inmunoabsorción con moléculas que tienen reactividad cruzada.

Se usan entonces los antisueros inmunoabsorbidos y reunidos en un inmunoensayo de unión competitiva para comparar la unión de una segunda proteína con la del antígeno peptídico de referencia. Para hacer esta comparación, cada una de las dos moléculas en un amplio rango de concentraciones y se determina la cantidad de cada molécula requerida para inhibir el 50% de la unión de los antisueros al antígeno peptídico de referencia inmovilizado. Si la cantidad de la segunda proteína requerida es menor de 10 veces la cantidad del péptido de referencia usado para producir el anticuerpo, entonces se dice que la segunda proteína se une específicamente a un anticuerpo generado para el antígeno peptídico de referencia.

La presencia de un polipéptido deseado (incluyendo péptido, producto de traducción o producto de digestión enzimática) en una muestra puede ser detectada y cuantificada usando análisis Western blot. La técnica consiste, en general, en separar los productos de la muestra por electroforesis en gel en base al peso molecular, transferir las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nilón o un filtro de nilón derivatizado) e incubar la muestra con anticuerpos de marcaje que se unen específicamente a la proteína analito. Los anticuerpos de marcaje se unen específicamente al analito sobre el soporte sólido. Estos anticuerpos son marcados directamente, o alternativamente se detectan después usando agentes de marcaje tales como anticuerpos (v.g., anticuerpos de oveja anti-ratón marcados donde el anticuerpo para un analito es un anticuerpo murino) que se unen específicamente al anticuerpo de marcaje.

6. *Detección de secuencias de péptidos de transmembrana GPCR, péptidos y peptidomiméticos que inhiben óptimamente las propiedades y funciones biológicas de los GPCR*

Los péptidos o variantes peptídicas de la invención que modulan la actividad biológica de los GPCR son generalmente identificados como sigue. Se seleccionan secuencias peptídicas a partir de los dominios de transmembrana del GPCR que se ha de abordar. Los dominios de transmembrana son fácilmente determinados por aplicación de modelos de ordenador a secuencias conocidas. También se utilizan modelado por ordenador y comparación con secuencias de péptidos de transmembrana conocidas para definir la orientación de la secuencia peptídica en la membrana, permitiendo así la determinación del extremo de la secuencia peptídica que se encuentra hacia el aspecto extracelular de la membrana plasmática. La selección de un dominio de transmembrana preferido para abordarlo es en gran medida empírica. Hemos visto que péptidos derivados del dominio de transmembrana 2 son inhibidores particularmente efectivos de la función GPCR. Alternativamente, secuencias peptídicas seleccionadas a partir del dominio de transmembrana 4 también han resultado ser antagonistas efectivos.

Al seleccionar una secuencia peptídica, se sintetiza una secuencia de transmembrana de referencia y se modifica sistemáticamente para identificar variantes (o análogos) que tengan propiedades mejoradas. Las modificaciones introducen una carga negativa en el extremo extracelular de la secuencia peptídica. Se pueden añadir cargas negativas en forma de residuos de aminoácidos ácidos tales como Asp o Glu. El número de residuos ácidos añadidos es típicamente de 1 a 3 dependiendo de la hidrofobicidad de la secuencia peptídica y de la posterior necesidad de aumentar la solubilidad del péptido. Además, los péptidos preferibles tienen una carga neutra en el extremo del péptido que se orienta hacia el aspecto intracelular de la membrana plasmática. Así, la naturaleza hidrofóbica global de dicho péptido de transmembrana dará lugar a inserción en una membrana y la carga negativa en el extremo extracelular dará lugar a que el péptido tenga la misma orientación que el dominio GPCR de transmembrana del que deriva. Se puede estudiar

la inserción en la membrana por microscopía fluorescente de análogos peptídicos marcados usando una metodología conocida para los expertos en la técnica, como se ilustra aquí en el Ejemplo 3.

En general, se determina la capacidad del péptido o de las variantes peptídicas para modular la actividad del GPCR de interés estudiando la capacidad del péptido para inhibir la activación inducida por un ligando natural del GPCR de interés. La activación de la mayoría de los GPCR da lugar a un aumento en el AMPc o a la liberación de calcio intracelular. Así, si la activación del GPCR de interés aumenta el AMPc, se determina la actividad inhibitoria del péptido midiendo los niveles de AMPc mediante métodos conocidos para los expertos en la técnica (véase, v.g., C. Nordstedt y B.B. Fredholm Anal. Chem. 189: 231-234 (1990)). De forma similar, si la activación del GPCR de interés libera calcio intracelular, se determina la actividad inhibitoria del péptido midiendo los niveles de calcio intracelular como se ilustra en los ejemplos que se dan a continuación.

Los péptidos pueden ser estudiados para otras propiedades, incluyendo las siguientes:

- mayor capacidad para modular la actividad GPCR;
- mayor resistencia a la proteólisis;
- mejor solubilidad;
- vida media más larga o más corta, particularmente en medio de cultivo o en un fluido biológico tal como plasma o sangre entera;
- mejor capacidad para insertarse en un compartimento de membrana, especialmente en una orientación particular, por medios conocidos en la técnica.

También se pueden sintetizar variantes peptídicas que tengan una o más de las siguientes modificaciones:

- sustitución conservadora o no conservadora de cualquiera de los residuos de aminoácidos;
- delección o adición de residuos en cualquier posición;
- modificación química de cualquier residuo;
- análogos peptidomiméticos del péptido de referencia.

Se pueden diseñar y/o rastrear variantes peptídicas racionalmente para usar metodologías de rastreo de alto rendimiento aplicadas a librerías combinatorias. Los métodos de generación de librerías combinatorias y de rastreo de tales librerías usando métodos de alto rendimiento son bien conocidos para los expertos en la técnica (véase, v.g., Baum, C&EN (7 de Febrero de 1994): 20-26, y las referencias allí citadas).

Estas variantes peptídicas son también estudiadas en cuanto a cualquiera de las propiedades antes enumeradas. En general, se considera que una variante peptídica tiene mejores propiedades en relación al péptido de referencia si una propiedad o parámetro mensurables dados tienen un valor que es al menos un 10%, preferiblemente al menos un 30%, más preferiblemente al menos un 75% y más preferiblemente al menos un 95% mejor que el valor para el péptido de referencia.

La capacidad relativa de los péptidos modificados (en comparación con el péptido de referencia) para modular una actividad biológica GPCR es estudiada como sigue. Se expone una línea celular que expresa un GPCR y exhibe una actividad biológica mediada por GPCR al péptido de referencia o al modificado en condiciones idénticas y se mide la propiedad biológica del GPCR en ausencia o presencia de cualquiera de los péptidos. Como ejemplos de líneas celulares, GPCR expresados por la línea celular y propiedades reguladas por GPCR medidas, se incluyen los siguientes:

- cualquier célula que expresa de manera estable CXCR4, especialmente células unidas, incluyendo células que están sometidas a ingeniería genética para expresar CXCR4, incluyendo células HeLa; CXCR4; flujo de calcio inducido por el factor I derivado de células del estroma;
- cualquier célula que exprese establemente CXCR4, especialmente células unidas, incluyendo células que están sometidas a ingeniería genética para expresar CXCR4, incluyendo células CM; CXCR4; infección por VIH-1;
- cualquier célula que exprese de forma estable CCKAR, especialmente células unidas, incluyendo células que están sometidas a ingeniería genética para expresar CCKAR, tales como células CHO; CCKAR; liberación de calcio inducida por colecistoquinina;

ES 2 299 242 T3

- cualquier que exprese de forma estable CCR5 humano. Especialmente células unidas, incluyendo células que están sometidas a ingeniería genética para expresar CCR5, incluyendo células HEK; CCR5; liberación de calcio inducida por RANTES.

5

Se mide la actividad inhibitoria exponiendo células que expresan GPCR a un rango de concentraciones de un antagonista de ensayo y midiendo una propiedad o actividad biológica asociada a ese GPCR. Las concentraciones de ensayo pueden variar de 1 nanomolar a 100 micromolar, dependiendo de la solubilidad y afinidad del péptido. Se realiza el rastreo inicial usando diluciones de factor 10, tales como 50, 5, 0,5 y 0,05 micromolar. Se reduce entonces la menor concentración activa en decrementos del 10% para determinar la menor concentración efectiva. La propiedad medida puede ser la unión a un ligando (por ejemplo, unión del octapéptido de colecistoquinina a CCKAR) o la producción de una respuesta metabólica mensurable (v.g., flujo alterado de iones o translocación, fosforilación alterada, síntesis o degradación de proteínas alterada, morfología celular alterada, secreción alterada, producción alterada de componentes particulares, tales como fosfatos de inositol solubles, unión de un virus y posterior infección, crecimiento tumoral, quimiotaxis, respuesta mitogénica, activación del crecimiento celular, secreción, contracción muscular, actividad vasopresora y vasodpresora, transmisión sináptica y liberación de calcio intracelular, etc.)

15

Se ha descrito que los siguientes GPCR tienen un papel en la infección por VIH:

20

STRL33 Solicitud Provisional EE.UU. N° 60/042.880;

CCRR5 Solicitud de Patente EE.UU. N° 60/042.880;

25

CCR8: Solicitud Provisional EE.UU. N° 60/054.094;

CCR2 Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 2752-2756 (1994)

J. Biol. Chem. 270: 29671-29675 (1995)

30

CCR3: J. Biol. Chem. 270: 16491-16494 (1995)

CX3CR1: DNA Cell Biol. 14: 673-680 (1995)

35

La siguiente es una lista de péptidos de transmembrana que tienen propiedades antagonistas de GPCR:

Del GPCR CXCR4

40

F-2-2: LLFVITLPFWAVDAVANWYFGNDD

F-2-5: LLFVITLPFWAVDAVANDD-OH

F-4-2: VYVGWIPALLLTIPDFIFANDD-OH

45

F-6-1: VILILAFFACWLPYYIGISID-OH

F-7-3: DDEALAFFHCCLNPILYAFL-NH₂

F-7-4: DDSITEALAFFHCCLNPILYAFL-NH₂

50

Del G PCR CCR5

CCR5-TM-2-2: LFFL LTVPFWAHYAAAQWDFGDD

55

CCR5-TM-4-1; FGVVTSVITWVVAVFASLPGIIFTSSDD

CCR5-TM-6-1: LIFTIMIVYFLFWAPYNIVLLLNTFQED

CCRS-TM-7-1: DDQAMQVTETLGMTHCCINPIIYAFV (no un péptido de la invención)

60

Del GPCR CCR2

CCR2-TM-2-1: IYLLNLAISDLLFLITLPLWADD-OH

65

CCR2-TM-2-2: LLFLITLPLWAH SAANEWVFGNDD-OH

CCR2-TM-4-1: FGVVTSVITWLVAVF ASVPGIIFTDD

ES 2 299 242 T3

CCR2-TM-6-1: VIFTIMIVYFLFWTPYN IVILLNTFQED

CCR2-TM-7-1: DDATQVT ETLGMTHCCINPIYAFV (no un péptido de la invención)

Del GPCR CCR3

CCR3-TM-2-1: LLFLVTLPFW IHYVRGHNWVFGDDD

CCR3-TM-4-1: FGVITSIVTWGLAVLAALPEFI FYETED

CCR3-TM-6-1: IFVIMAVFFI FWTPYNVAILLSSYQSDD

CCR3-TM-7-1: DDLVMLVTEVIAYSHCCMNPIYAFV (no un péptido de la invención)

Del GPCR CCKAR

CCKAR-TM-1-6: DDEWQSALQILLYSIIFLLSVLGNTLVITV (no un péptido de la invención)

CCKAR-TN-2-1: FLLSLAVSDLMLCLFCMPFNLP

CCKAR-TM-2-2: FLLSLAVSDLMLCLFCM PFNLIDD

CCKAR-TM-6-4: IVVLFFLCWMPIFSANAWRAYDTVDD

7. Realizaciones de tratamiento

Las composiciones que contienen los presentes péptidos de transmembrana GPCR, o un cóctel de los mismos (es decir, con otras moléculas, incluyendo otros péptidos de la invención), pueden ser administradas para tratamientos terapéuticos. Las moléculas de la presente invención son usadas para proteger a un paciente de patologías asociadas a GPCR, modulando las actividades biológicas asociadas al GPCR. “Protección” frente a la infección o la enfermedad, tal como se usa aquí, pretende abarcar “prevención” o “tratamiento.” “Tratamiento” incluye la administración de la composición protectora a un paciente que exhibe síntomas de una patología asociada a GPCR (por ejemplo, infección por VIH-1), para reducir o suprimir los síntomas de la patología. Otros ejemplos de condiciones asociadas a GPCR que pueden ser tratadas con los péptidos de la invención incluyen:

- cáncer. Por ejemplo, se sabe que el receptor del péptido intestinal vasoactivo (VIP) se sobreexpresa en el cáncer de mama y el cáncer de pulmón y se sabe que los antagonistas del VIP inhiben el crecimiento tumoral. Así, un péptido de la invención es probablemente efectivo en la inhibición de tales cánceres;
- antagonistas de los receptores de quimiokinas como fármacos antiinflamatorios y antiasmáticos;
- rechazo de tejidos;
- antagonistas del receptor del neuropéptido Y como fármacos antiobesidad;
- antagonistas del receptor de dopamina D4 como fármacos para el tratamiento de la depresión, del trastorno de hiperactividad con déficit de atención y de la esquizofrenia;
- antagonistas del Receptor del Factor Liberador de Corticotropina para el tratamiento de trastornos relacionados con la depresión y la ansiedad;
- antagonistas del receptor de angiotensina como medio de control de la presión sanguínea;
- antagonistas del receptor del péptido liberador de gastrina y de los receptores de somatostatina y gastrina como agentes antineoplásicos que enlentecen el crecimiento de tumores endocrinos;
- antagonistas de los receptores de opioides como aniquiladores del dolor.

a. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones para administración pueden estar en forma de solución, suspensión, tabletas, píldoras, cápsulas, polvo, gel, crema, loción, ungüento, aerosol o similares. En una realización preferida, las composiciones para administración consisten en una solución de los péptidos de transmembrana GPCR disueltos en un soporte farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un soporte acuoso. Se puede usar una variedad de soportes acuosos, v.g., solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y están generalmente libres de materia indeseable. Estas composiciones pueden ser esterilizadas por técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. En algunas realizaciones, los péptidos de transmembrana GPCR son presentados en forma de polvo.

Se pueden combinar los péptidos de transmembrana GPCR y análogos con excipientes convencionales, tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes para el ajuste del pH y tamponantes, agentes para el ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración del GPCR en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará primariamente en base a los volúmenes de fluidos, a las viscosidades, al peso corporal y similares según el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente.

b. Administración y dosificación

Se administra la composición o el medio farmacéutico que contiene un péptido de transmembrana GPCR por vía oral, parenteral, enteral, gástrica, tópica, subcutánea, rectal, local o sistémica. Por ejemplo, los compuestos pueden ser inyectados en el torrente sanguíneo usando una cánula o un catéter; se selecciona la vena o arteria para maximizar la administración al/a los tejido(s) afectado(s). Los métodos reales para preparar composiciones administrables por vía parenteral serán conocidos o aparentes para los expertos en la técnica y se describen con más detalle en publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980). Se reconoce que los péptidos y polipéptidos de transmembrana GPCR y compuestos relacionados antes descritos, cuando se administran oralmente, deben ser protegidos de la digestión. Se consigue esto típicamente acomplejando la proteína con una composición para hacerla resistente a la hidrólisis ácida y enzimática o empaquetando la proteína en un soporte apropiadamente resistente, tal como un liposoma. Se conocen bien la técnica medios de protección de proteínas frente a la digestión.

En aplicaciones terapéuticas, las composiciones son administradas a un paciente que sufre de una enfermedad o condición en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad o condiciones y sus complicaciones. Se define una cantidad adecuada para conseguirlo como una "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad de las condiciones que se han de tratar y del estado general de salud del paciente.

En general, la dosificación que se ha de administrar es la cantidad necesaria para modular una actividad biológica GPCR. Se entiende que la dosificación de un polipéptido GPCR de la presente invención dependerá de la edad, del sexo, de la salud y del peso del receptor, del tipo de tratamiento concurrente, de haberlo, de la frecuencia de tratamiento y de la naturaleza del efecto deseado. Los rangos de dosis efectivas aquí proporcionados no pretenden limitar a los inventores y representan rangos preferidos de dosis. La dosificación más preferida será adaptada al sujeto individual, como entiende y puede determinar un experto en la técnica, sin excesiva experimentación. Se contempla que los compuestos serán administrados bajo la guía de un médico, quien determinará las dosificaciones exactas, monitorizará el progreso del tratamiento y determinará si una administración dada es eficaz y suficiente, o si se necesitan posteriores administraciones.

La concentración de compuestos que se ha de administrar en un tiempo dado y a un paciente dado variarán de 0,1 μg a 100 mg y preferiblemente de 0,1 a 10 mg al día por paciente. La dosificación y el modo de administración pueden ser seleccionados para conseguir y eventualmente mantener una concentración local en los fluidos que contactan con las células diana de aproximadamente 0,001-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, preferiblemente de 0,1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se pueden usar dosificaciones de 0,1 a aproximadamente 100 mg por paciente al día, particularmente cuando se administra el fármaco a un sitio apartado y no al torrente sanguíneo, tal como a una cavidad corporal o un lumen de un órgano. Son posibles dosificaciones substancialmente mayores en administración tópica.

Pueden ser necesarias administraciones únicas o múltiples de las composiciones dependiendo de la dosificación y de la frecuencia requeridas y toleradas por el paciente. En cualquier caso, la composición debe aportar una cantidad suficiente de los péptidos de esta invención para tratar con efectividad al paciente.

c. Terapia génica

La presente invención describe ácidos nucleicos codificantes de péptidos de transmembrana GPCR empaquetables para la transformación de células *in vitro* e *in vivo*. Estos ácidos nucleicos empaquetables pueden ser insertados en cualquiera de una serie de vectores bien conocidos para la transfección y transformación de células y organismos diana.

Los ácidos nucleicos son transfectados en células, *ex vivo* o *in vivo*, a través de la interacción del vector y de la célula diana. El ácido nucleico codificante del péptido de transmembrana GPCR, bajo el control de un promotor, expresa entonces el péptido de transmembrana GPCR, modulando así la actividad biológica de un GPCR diana.

Se han usado dichos procedimientos de terapia génica para corregir defectos genéticos adquiridos y heredados, el cáncer y la infección vírica en una serie de contextos. La capacidad para expresar genes artificiales en humanos facilita la prevención y/o la cura de muchas enfermedades humanas importantes, incluyendo muchas enfermedades que no pueden ser llevadas a tratamiento mediante otras terapias. Como ejemplo, la expresión *in vivo* de genes reguladores del colesterol, genes que bloquean selectivamente la replicación del VIH y genes supresores de tumores en pacientes

humanos mejora dramáticamente el tratamiento de la enfermedad cardíaca, del SIDA y del cáncer, respectivamente. Para una revisión de procedimientos de terapia génica, véase Anderson, Science (1992) 256:808-813; Nabel y Felgner (1993) TIBTECH 11: 211-217; Mitani y Caskey (1993) TIBTECH 11: 162-166; Mulligan (1993) Science 926-932; Dillon (1993) TIBTECH 11: 167-175; Miller (1992) Nature 357: 455-460; Van Brunt (1988) Biotechnology 6(10): 1149-1154; Vigne (1995) Restorative Neurology and Neuroscience 8: 35-36; Kremer y Perricaudet (1995) British Medical Bulletin 51(1) 31-44; Haddada y col., (1995), en CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, Doerfler Böhm (eds.) Springer-Verlag, Heidelberg, Alemania; y Yu y col., GENE THERAPY (1994) 1:13-26.

La administración del gen o del material génico a la célula es la primera etapa crítica en el tratamiento con terapia génica de la enfermedad. Un gran número de métodos de administración son bien conocidos para los expertos en la técnica. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, administración de genes basada en liposomas (Debs y Zhu (1993), WO 93/24640; Mannino y Gould-Fogerite (1988), BioTechniques 6(7): 682-691; Rose, Pat. EE.UU. N° 5.279.833; Brigham (1991), WO 91/06309; y Felgner y col., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7414) y vectores retrovíricos defectivos en cuanto a replicación que albergan una secuencia polinucleotídica terapéutica como parte del genoma retroviral (véanse, v.g., Miller y col. (1990), Mol. Cell. Biol. 10:4239 (1990); Kolberg (1992), J. NIH Res. 4:43, y Cornetta y col., Hum. Gene Ther. 2:215 (1991)). Como vectores retrovíricos ampliamente usados, se incluyen los basados en el virus de la leucemia murina (MuLV), el virus de la leucemia de monos gibones (GaLV), el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y sus combinaciones. Véanse, v.g., Buchscher y col., (1992) J. Virol. 66(5) 2731-2739; Johann y col. (1992) J. Virol. 66 (5):1635-1640 (1992); Sommerfelt y col., (1990) Virol. 176:58- 59; Wilson y col., (1989) J. Virol. 63:2374-2378; Miller y col., J. Virol. 65:2220-2224 (1991); Wong-Staal y col., PCT/US94/05700, y Rosenberg y Fauci (1993) en Fundamental Immunology, Tercera Edición, Paul (ed.) Raven Press, Ltd., New York y las referencias allí citadas e Y. y col., GENE THERAPY (1994), antes citado).

También se usan vectores basados en AAV para transducir células con ácidos nucleicos diana, v.g., en la producción *in vitro* de ácidos nucleicos y péptidos y en procedimientos de terapia génica *in vivo* y *ex vivo*. Véanse West y col., (1987) Virology 160: 38- 47; Carter y col., (1989), Patente EE.UU. N° 4.797.368; Carter y col., WO 93/24641 (1993); Kotin (1994), Human Gene Therapy 5:793- 801; Muzyczka (1994), J. Clin. Invest. 94:1351, y Samulski (antes citado) para una revisión de vectores AAV. Se describe la construcción de vectores AAV recombinantes en una serie de publicaciones, incluyendo Lebkowski, Pat. EE.UU. N° 5.173.414; Tratschin y col., (1985), Mol. Cell. Biol. 5(11):3251-3260; Tratschin y col., (1984), Mol. Cell. Biol., 4:2072-2081; Hermonat y Muzyczka (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466-6470; McLaughlin y col., (1988), y Samulski y col. (1989), J. Virol., 63:03822-3828. Como líneas celulares que pueden ser transformadas por rAAV, se incluyen las descritas en Lebkowski y col. (1988), Mol. Cell. Biol., 8:3988-3996.

i. *Transferencia génica in vitro*

Se espera que los expertos en la técnica tengan conocimientos de los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de ADN codificante de péptidos de transmembrana GPCR o de un fragmento peptídico de los mismos. No se hace aquí intento alguno de describir con detalle los diversos métodos conocidos para la expresión de proteínas en procariontes o eucariontes.

Existen varios métodos bien conocidos de introducción de ácidos nucleicos en células bacterianas y animales, cualquiera de los cuales puede ser usado en la presente invención. Estos incluyen: precipitación con fosfato de calcio, fusión de las células receptoras con protoplastos bacterianos que contienen el ADN, tratamiento de las células receptoras con liposomas que contienen el ADN, DEAE-dextrano, endocitosis mediada por receptores, electroporación, microinyección del ADN directamente en las células, infección con vectores víricos, etc.

Para aplicaciones *in vitro*, se puede realizar la administración de ácidos nucleicos a cualquier célula crecida en cultivo, ya sea de origen bacteriano, vegetal o animal, de vertebrados o invertebrados, y de cualquier tejido o tipo. El contacto entre las células y las construcciones de ácidos nucleicos de ingeniería genética, cuando se realiza *in vitro*, tiene lugar en un medio biológicamente compatible. La concentración de ácido nucleico varía ampliamente dependiendo de la aplicación particular, pero es generalmente de entre aproximadamente 1 μ mol y aproximadamente 10 mmol. El tratamiento de las células con el ácido nucleico es generalmente llevado a cabo a temperaturas fisiológicas (aproximadamente 37°C) durante períodos de tiempo de aproximadamente 1 a 48 horas, preferiblemente de aproximadamente 2 a 4 horas.

En un grupo de realizaciones, se añade un ácido nucleico a células plaqueadas con una confluencia de un 60-80% que tienen una densidad celular de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^5 células/mL, más preferiblemente de aproximadamente 2×10^4 células/mL. La concentración de la suspensión añadida a las células es preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 0,2 μ g/mL, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 μ g/mL.

ii. *Transferencia génica in vivo*

Alternativamente, los ácidos nucleicos codificantes de los péptidos de transmembrana GPCR pueden ser también introducidos en células diana *in vivo*, usando métodos recombinantes bien conocidos para los expertos en la técnica. La inserción de genes en células con el fin de una terapia medicinal es un campo de rápido crecimiento en medicina

que tiene un enorme potencial clínico. La investigación en terapia génica ha experimentado un avance durante varios años y ha entrado en pruebas clínicas en humanos. Zhu y col., Science, 261:209-211 (1993), aquí incorporada como referencia, describe la administración intravenosa del plásmido de expresión de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) de citomegalovirus (CMV) usando complejos DOTMA-DOPE. Hyde y col., Nature, 362:250-256 (1993), aquí incorporada como referencia, describe la administración del gen regulador de la conductancia de transmembrana en la fibrosis quística (CFTR) a los epitelios de las vías aéreas y a los alvéolos del pulmón de ratones usando liposomas. Brigham y col., Am. J. Med. Sci., 298:278-281 (1989), aquí incorporada como referencia, describe la transfección *in vivo* de pulmones de ratones con un gen procariótico funcional codificante de la enzima intracelular cloranfenicol acetiltransferasa (CAT).

Como formulaciones adecuadas para administración, se incluyen soluciones para inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del pretendido receptor, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes suspensores, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. Las formulaciones de ácido nucleico empaquetado pueden ser presentadas en recipientes sellados de dosis unitaria o de dosis múltiple, tales como ampollas y viales. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección a partir de polvos, gránulos, y tabletas estériles del tipo antes descrito.

Para administración *in vivo*, se administran preferiblemente composiciones farmacéuticas que contienen ácidos nucleicos codificantes de péptidos de transmembrana GPCR por vía parenteral, es decir, intraarticular, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscularmente. Más preferiblemente, las composiciones farmacéuticas son administradas intravenosa o intraperitonealmente mediante una inyección en bolo. Por ejemplo, véase Stadler y col., Patente EE.UU. N° 5.286.634, aquí incorporada como referencia. También se ha discutido la administración intracelular de ácidos nucleicos en Straubinger y col., Methods in Enzymology, Academic Press, New York, 101:512-527 (1983); Mannino y col., Biotechniques, 6:682-690 (1988); Nicolau y col., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 6:239-271 (1989), y Behr, Acc. Chem. Res., 26:274-278 (1993). Se describen aún otros métodos de administración de agentes terapéuticos en, por ejemplo, Rahman y col., Patente EE.UU. N° 3.993.754; Sears, Patente EE.UU. N° 4.145.410; Papahadjopoulos y col., Patente EE.UU. N° 4.235.871; Schneider, Patente EE.UU. N° 4.224.179; Lenk y col., Patente EE.UU. N° 4.522.803; y Fountain y col., Patente EE.UU. N° 4.588.578.

En realizaciones preferidas, las preparaciones farmacéuticas pueden ponerse en contacto con el tejido diana por aplicación directa de la preparación al tejido. Se puede hacer la aplicación por procedimientos tópicos "abiertos" o "cerrados". Por "tópico", se quiere decir la aplicación directa de la preparación farmacéutica a un tejido expuesto al ambiente, tal como la piel, la orofaringe, el canal auditivo externo y similares. Procedimientos "abiertos" son aquellos procedimientos que incluyen la incisión de la piel de un paciente y la visualización directa del tejido subyacente al que se aplican las preparaciones farmacéuticas. Se hace esto generalmente por un procedimiento quirúrgico, tal como una toracotomía para acceder a los pulmones, una laparotomía abdominal para acceder a las vísceras abdominales u otra aproximación quirúrgica directa al tejido diana. Los procedimientos "cerrados" son procedimientos invasivos en los que no se visualizan directamente los tejidos diana internos, sino que se accede a ellos insertando instrumentos a través de pequeñas heridas en la piel. Por ejemplo, se pueden administrar las preparaciones al peritoneo mediante lavado con aguja. De igual modo, se pueden administrar las preparaciones a través de dispositivos endoscópicos.

El ácido nucleico puede ser también administrado en un aerosol inhalado por los pulmones (véase Brigham y col., Am. J. Sci., 298(4):278-281 (1989)) o por inyección directa en el sitio de la enfermedad (Culver, Human Gene Therapy, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York, pp.70-71 (1994)).

Las dosis efectivas de las composiciones variarán dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo el medio de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente y otras medicaciones administradas. Así, las dosificaciones de tratamiento necesitarán ser tituladas para optimizar la seguridad y la eficacia. Al determinar la cantidad efectiva del vector que se ha de administrar, el médico evalúa el ácido nucleico particular usado, el estado de la enfermedad diagnosticada, la edad, el peso y la condición del paciente, los niveles de plasma circulante, las toxicidades del vector, la progresión de la enfermedad y la producción de anticuerpos anti-vector. El tamaño de la dosis será también determinado por la existencia, la naturaleza y el alcance de los efectos colaterales que acompañan a la administración de un vector particular. Son típicas dosis de aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 μ g a 10 mg o 30-300 μ g de ADN por paciente. Las dosis varían generalmente entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 10^8 - 10^{10} o 10^{12} partículas por inyección. En general el equivalente de dosis de un ácido nucleico desnudo de un vector es de aproximadamente 1 μ g a 100 μ g para un paciente típico de 70 kilogramos y las dosis de vectores que incluyen una partícula retroviral son calculadas para obtener una cantidad equivalente de ácido nucleico inhibidor.

Antes de la infusión, se obtienen muestras de sangre y se guardan para su análisis. Se infunden entre 10^8 y 1×10^{12} vectores intravenosamente a lo largo de 60-200 minutos. Se monitorizan estrechamente los signos vitales y la saturación de oxígeno por oximetría de pulso. Se obtienen muestras de sangre 5 minutos y 1 hora tras la infusión y se guardan para su posterior análisis. A discreción del médico, se repite la reinfusión cada 2 a 3 meses por un total de 4 a 6 tratamientos en un período de un año. Tras el primer tratamiento, se pueden realizar infusiones en régimen de pacientes externos a discreción del clínico. Si se da la reinfusión como paciente externo, se monitoriza al participante durante al menos 4, y preferiblemente 8, horas después de la terapia.

Si un/una paciente que experimenta infusión de un vector o célula transducida desarrolla fiebre, escalofríos o dolores musculares, éste/ésta recibe la dosis apropiada de aspirina, ibuprofeno o acetaminofeno. Los pacientes que experimentan reacciones a la infusión, tales como fiebre, dolores musculares y escalofríos son premedicados 30 minutos antes de las infusiones futuras con aspirina, acetaminofeno o difenhidramina. Se usa meperidina para los escalofríos y dolores musculares más graves que no responden rápidamente a antipiréticos y antihistamínicos. Se enlentece o interrumpe la infusión del vector dependiendo de la gravedad de la reacción.

Se puede practicar la transferencia génica *in vivo* en una variedad de hospedadores. Como hospedadores preferidos, se incluyen especies de mamíferos, tales como humanos, primates no humanos, perros, gatos, vacas, caballos, ovejas y similares.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son simplemente realizaciones de la invención y no pretenden limitar la invención. Una persona con conocimientos ordinarios en la técnica puede modificar y/o adaptar la invención para diversas aplicaciones sin excesiva experimentación, sin desviarse del concepto genérico de la presente invención. Por lo tanto, dichas adaptaciones y modificaciones quedan dentro del alcance y rango de la presente invención.

Ejemplo 1

El Ejemplo 1 ilustra que los péptidos derivados de regiones de transmembrana de CXCR4 inhiben los flujos de calcio mediados por CXCR4.

Se sintetizaron péptidos que tenían las secuencias seleccionadas por síntesis de péptidos en fase sólida de flujo a través en un Sintetizador de Péptidos 432A de Applied Biosystems utilizando derivados de aminoácidos Fmoc. Para resolver la agregación que con frecuencia se produce durante la síntesis de péptidos hidrofóbicos y da lugar al bloqueo de la cadena peptídica en crecimiento, se introdujeron derivados FmocHmb de Ala, Val y Leu en las secuencias difíciles. Se añadieron residuos cargados a los extremos de los péptidos para asegurar una orientación apropiada de los péptidos durante la penetración en la membrana celular y para mejorar la solubilidad de los péptidos altamente hidrofóbicos.

Se valoró la pureza de los péptidos por HPLC de fase invertida y se confirmaron las estructuras por espectrometría de masas de desorción de láser con tiempo de vuelo asistida por matriz (MALDI-TOF) (Tarasova y col., (1998), Ad. Exp. Med. Biol., Plenum Press, NY, pp. 201-206).

Los péptidos usados en este ejemplo están indicados en las Tablas 1, 2 y 3.

Se estudió el efecto de los péptidos sobre los flujos de calcio mediados por CXCR4 en células HeLa que expresan de forma natural el receptor CXCR4 y células U87 que expresan de forma estable el receptor CXCR4 como sigue. Se incubaron células cultivadas en portaobjetos con cámara de vidrio con cubierta Nunc con Fura-2/AM 1 micromolar durante 20 min. en una incubadora de CO₂, se lavaron con PBS y se montaron en la pletina de un microscopio invertido Zeiss Axiovert. Se realizaron las mediciones de la [Ca²⁺]_i usando un sistema de imagen digital Attofluor (Atto Instruments, Rockville, MD). Se excitó la fluorescencia de Fura a una longitud de onda alternante de 340 y 380 nm. Se monitorizó la fluorescencia mediante una cámara CCD intensificada usando un filtro de corte 505. Se realizaron las calibraciones de la [Ca²⁺]_i usando patrones de Ca²⁺ que contenían Fura 1 micromolar. Se estudiaron los antagonistas CXCR4 en células HeLa y células U87. Se usó factor-1α derivado de estroma (SDF-1α) como agonista CXCR4 específico.

Los antagonistas CCR5, que fueron usados en estudios de selectividad como se describe a continuación, fueron estudiados en células HEK (carcinoma renal humano) que expresaban de forma estable el receptor CCR5, y se usó RANTES como agonista. Se evaluó la actividad antagonista de los péptidos midiendo la inhibición de la liberación de Ca²⁺_i intracelular evocada por agonistas. Estas mediciones fueron llevadas a cabo en células tratadas con Fura-2/AM, utilizando un sistema de imagen digital Attofluor como se ha descrito antes. El agonista fue SDF-1α.

En el cribado preliminar, se vio que los péptidos correspondientes al segundo y sexto dominios de transmembrana abolían la señalización inducida por SDF-1α a través del receptor CXCR4 (Tabla 1). Otros estudios de optimización y de estructura-actividad permitieron obtener antagonistas derivados de todos menos del tercer y quinto dominios de transmembrana (Tabla 2).

ES 2 299 242 T3

TABLA 1

Actividad de péptidos sintéticos correspondientes a dominios de transmembrana predichos de CXCR4 en la inhibición de la liberación de calcio intracelular inducida por SDF-1 α

Péptido	Concentración requerida para la completa inhibición de la liberación de [Ca ²⁺ _i]
F-1-5: DDIFLPTIYSIIIFLTGIV-HN ₂	> 30 μ M
F-2-1: LLFVITLPFWAVDAVANWYFGN-OH	5 μ M
F-3-1: KAVHVIYTVNLYSSVLILAFISL-NH ₂	> 50 μ M
F-4-1: KVYVGWIPALLLTIPDFIF-OH	> 50 μ M
F-5-1: HIMVGLILPGIVILSCYCIH-NH ₂	>50 μ M
F-6-1: VILILAFFACWLPYYIGISID-OH	10 μ M
F-7-1: ALAFFHCCLNPILYAFLGAK-NH ₂	> 100 μ M

TABLA 2

Actividad biológica de antagonistas CXCR4 derivados de diferentes dominios de transmembrana. Se determinó la actividad anti-señalización en la inhibición de la liberación del calcio intracelular inducido por SDF-1 α . Se valoró la actividad anti-VIH-1 en un ensayo de citoprotección utilizando células CEM-SS infectadas con VIH-1_{RF}

Péptido	Concentración requerida para la inhibición de la transducción de señal (μ M)	CE ₅₀ en ensayo anti-VIH-1 (μ M)
F-2-2 LLFVITLPFWAVDAVANWYFGNDD	0,2	2,27
F-4-2 VYVGWIPALLLTIPDFIFANDD-OH	5	0,3
F-6-1 VILILAFFACWLPYYIGISID-OH	10	> 50
F-7-3 DDEALAFFHCCLNPILYAFL-NH ₂	25	3,27
F-6-1 + F-7-3	1	Sin datos

Para entender aún más los requerimientos estructurales para un antagonista eficaz, se realizaron estudios de estructura-actividad sobre los péptidos derivados del segundo dominio de transmembrana de CXCR4 (Tabla 3). El antagonista más potente, un péptido de 24 residuos de aminoácido F-2-2, bloqueó por completo la transducción de señal a 0,2 micromoles. La adición de residuos cargados negativamente a los extremos pareció ser importante para la actividad. La eliminación de las cargas negativas añadidas aportadas por dos residuos de Asp C-terminales (F-2-1) disminuyó la potencia antagonista más de diez veces. Consistentemente con estos hallazgos, La sustitución de residuos de aspartato cargados negativamente con lisinas cargadas positivamente (F-2-3) dio lugar a una reducción de 100 veces en la actividad antagonista. La delección de cinco residuos que preceden a los aspartatos C-terminales (F-2-4) redujo la potencia 20 veces. La truncación de la porción de transmembrana por tres residuos N-terminales Leu-Leu-Phe volvió al péptido inactivo.

TABLA 3

Relaciones estructura-actividad en péptidos derivados del segundo dominio de transmembrana de CXCR4: ...HLSVADLLFVITLPEFWAVDAVANWYFGNFLCK... (la porción predicha de intramembrana está subrayada)

Péptido	Concentración requerida para la completa inhibición de la liberación de $[Ca^{2+}]_i$
F-2-1: LLFVITLPEFWAVDAVANWYFGN-OH	5 μ M
F-2-2: LLFVITLPEFWAVDAVANWYFGNDD-OH	0,2 μ M
F-2-8: LLFVITLPEFWAVDAVANWYFGNKK-OH	20 μ M
F-2-4: VITLPEFWAVDAVANWYFGNKK-OH	> 50 μ M
F-2-5: LLFVITLPEFWAVDAVANDD-OH	10 μ M
AcF-2-5: AcLLFVITLPEFWAVDAVANDD-OH	10 μ M
F-2-6: LSVADLLFVITLPEFWAVDAVANDD-OH	20 μ M
Rhod - F-2: AcLLFVITLPEFWAVDAVANWYFGNDDK (Rhod) D-OH	8 μ M

Se observaron también resultados similares para péptidos derivados de regiones de transmembrana adicionales. Por ejemplo, en el caso de péptidos correspondientes al cuarto dominio de transmembrana, el posicionamiento del residuo cargado en el extremo intracelular del péptido (F-4-1, Tabla 1) en lugar del extremo extracelular (F-4-2, Tabla 2) abolió la actividad antagonista. Además, la sustitución de aspartatos extracelulares con lisinas también abolió la actividad antagonista (datos no mostrados).

La especificidad de la interacción del dominio de transmembrana quedó demostrada por el hecho de que todos los péptidos derivados de CXCR4 mostraban selectividad por ese receptor y no tenían influencia sobre la señalización del otro receptor de quimiokina, CCR5. De forma similar, un péptido derivado del segundo dominio de transmembrana de CCR5, LFFLLTVPFWAHYAAQWDFGDD, abolía por completo la señalización inducida por agonistas del receptor en células U87 a concentraciones 500 nM, pero no tenía efecto sobre la señalización de CXCR4.

Se observó además que una mezcla equimolar de dos péptidos, F-6-1 y F-7-3, era un orden de magnitud más potente que el más activo de los dos péptidos. Este efecto sinérgico producido por los derivados de la sexta y séptima regiones de transmembrana puede ser un fenómeno general. Así, parejas de análogos TM en combinaciones optimizadas pueden actuar como antagonistas muy potentes.

Ejemplo 2

El Ejemplo 2 ilustra que péptidos sintéticos correspondientes a los dominios de transmembrana de CXCR4 inhiben la infección por VIH mediada por CXCR4.

Se cree que CCR5 y CXCR4 son los principales correceptores para la entrada en la célula de VIH-1 (Broder y col. (1997), *J. Leukoc. Biol.* 62:2029; Doranz y col. (1997), *Immunol. Res.* 16: 1528; Premack and Schall (1996), *Nat. Med.* 2:1174-1178), aunque otros receptores de quimiokinas parecen mediar en la infección también (Michael y col., (1997) *Nat. Med.* 3_(10):11602).

Se estudió la capacidad de péptidos derivados de CXCR4 sintéticos de la Tabla 1 para inhibir la infección por VIH-I de células CEM-SS usando una cepa LAV del virus que se sabe utiliza CXCR4 como correceptor. Anti-HIV-1 assay, Buckheit y col. (1993), *Antiviral Research* 21:247. Se mantuvieron las células CEM-SS en medio RPMI 1640 que contenía un 10% de suero bovino fetal. Se pusieron las células en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos hasta una densidad de 5×10^3 células por pocillo. Se infectaron las células con virus VIH-1 a una multiplicidad de infección (MDI) previamente determinada para producir un nivel máximo de producción vírica a los 6 días de la infección (MDI de 0,01).

Se añadieron diluciones medio log seriadas de los compuestos de ensayo a los pocillos apropiados por triplicado para evaluar su capacidad para inhibir la infección por VIH-1. Se usó AZT paralelamente como control positivo. Después de 6 días de incubación a 37°C, se determinó la presencia y la abundancia relativa de proteína p24 vírica por ELISA en sobrenadantes libres de células derivados de cada pocillo de la placa de microtitulación. Se compró el kit ELISA p24 al AIDS Vaccine Program, NCI, FCRDC (Frederick, MD) y se realizó el ensayo según las instrucciones del fabricante.

La mayoría de los péptidos de la Tabla 1 mostraron alguna actividad antivírica (datos no mostrados). Sin embargo, los péptidos correspondientes al segundo y sexto dominios de transmembrana eran los más potentes en la inhibición de la entrada del VIH. El compuesto F-2-2 inhibió por completo la infección a una concentración 5 micromolar (Fig. 1).

Se usaron los péptidos correspondientes a los dominios de transmembrana del receptor de tipo A de colecistokinina (CKAR) como controles negativos y no afectaron a la función CXCR4, confirmando así la especificidad del efecto.

Los péptidos no mostraron toxicidad celular a concentraciones de hasta 100 micromolar (no se pudieron estudiar concentraciones mayores por problemas de solubilidad).

Se estudió adicionalmente la capacidad de los péptidos sintéticos para inhibir la infección por VIH-1 por un ensayo de citoprotección usando la cepa altamente citopática de VIH-1 RF (Rice y col. (1995), *Adv. Pharmacol.* 33:389) (Tabla 2). El péptido más potente, F-4-2, inhibía por completo la infección a una concentración 1 micromolar (Fig. 2). Los péptidos usados como controles negativos, que corresponden a los dominios de transmembrana del receptor de colecistokinina tipo A, no afectaron las funciones de los receptores de quimiokinas.

Los anteriores resultados demuestran, en general, la capacidad de moléculas externamente añadidas para competir por la interacción entre los dominios de transmembrana de los GPCR y así alterar la función de los receptores (Figura 3). Además, es importante observar que los péptidos de la invención inhiben la infección por VIH dirigiéndose a una molécula y una función celular más que a una molécula y una función vírica. Las proteínas víricas tienen una tasa de mutación relativamente alta, que con frecuencia permite a los virus hacerse resistentes a un tratamiento dado. Dado que las proteínas celulares mutan a un ritmo mucho más lento, la probabilidad de que un virus pueda desarrollar una resistencia está muy reducida.

Ejemplo 3

El Ejemplo 3 muestra que los péptidos de la invención se reparten entre la membrana plasmática y otros compartimentos de membrana.

Se sintetizó un derivado fluorescente de CXCR4 TM2, rodamina-F-2, por síntesis en fase sólida en un Sintetizador de Péptidos 432A de Applied Biosystems utilizando derivados de aminoácidos Fmoc. Se cargó rodamina B (Fluka) en la columna de aminoácidos del instrumento. Se valoró la pureza del péptido por HPLC de fase invertida y se confirmaron las estructuras por espectrometría de masas de desorción láser asistida por matriz.

Se usó una proteína quimérica consistente en el CXCR4 y la proteína fluorescente verde (GFP) para estudiar la localización, la internalización y el reciclado de receptores en células vivas en tiempo real. Se hizo esta construcción y se expresó de forma estable en células HeLa como se describe en Tarasova y col. (1997), J. Biol. Chem. 272:14817-14824. La fusión del extremo C del CXCR4 con el extremo N de la GFP no parecía alterar la afinidad de unión receptor-ligando, la transducción de señal o el patrón de expresión y distribución en superficie de los receptores.

Se cultivaron células HeLa transfectadas que expresaban CXCR4-GFP en placas de fondo de vidrio con cubierta de 50 mm revestidas (MatTek, MA) en medio sin rojo fenol. Se expusieron entonces las células a péptido 1 micromolar en medio DMEM durante 30 min. en una incubadora de CO₂. Se determinó la distribución de marcaje fluorescente por microscopía de barrido láser confocal en un microscopio confocal de barrido láser LSM 410 invertido Zeiss. Se excitó la fluorescencia de la GFP usando un láser de argón/kriptón de 488 nm; se detectó la fluorescencia emitida con un filtro de 515-540 nm de pase de banda. Para el rojo de rodamina, se usó un láser de helio/neón de 568 nm para la excitación y se detectó la fluorescencia con un filtro de 590-640 nm de pase de banda.

Los resultados demostraron que el péptido rodaminado se colocalizaba con el CXCR4-GFP y estaba presente en la membrana celular en cuestión de minutos tras la aplicación y saturaba los endosomas y el retículo endoplásmico después de 15 minutos de incubación. Esto confirmaba la capacidad de los péptidos para concentrarse en las membranas celulares y sugería que los péptidos interactuaban con las moléculas del receptor.

Ejemplo 4

El Ejemplo 4 muestra que los péptidos correspondientes a dominios de transmembrana del receptor de colecistokina de tipo A (CCKAR) inhiben la liberación de calcio intracelular evocada por agonistas con una potencia similar a los compuestos CXCR4.

Para mayor ilustración de la presente invención, hemos sintetizado péptidos derivados de los dominios de transmembrana del receptor de colecistokina de tipo A (CCKAR) de la rata. Aunque CCKAR pertenece a la misma familia de rodopsinas de los GPCR que CXCR4, su secuencia es sólo idéntica en un 15% a la de CXCR4, cuando se alinean usando el programa Dialign 2 (Morgenstern y col. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:12098) y el grado de identidad en las regiones de transmembrana es sólo del 27%.

La actividad de los péptidos del dominio de transmembrana CCKAR fue estudiada en células CHO transfectadas que expresan establemente CCKAR de rata (Tarasova y col. (1997), J. Biol. Chem. 272: 14817-14824). El agonista CCKAR era el octapéptido de colecistokina sulfatado. Se realizó la determinación de la liberación de calcio intracelular como se ha descrito en el ejemplo 1 anterior. En la Tabla 4 se muestran los resultados.

Ninguno de los péptidos derivados de CCKAR sirvió como antagonista de los receptores de quimiokina y ninguno pudo inhibir la infección por VIH-1. La actividad de los antagonistas en la inhibición de la señalización a través del receptor fue comparada con la capacidad para prevenir la unión de agonistas (Tabla 4). Se valoró la inhibición de la señalización en la liberación de calcio intracelular evocada con CCK-8 en células CHO tratadas con FURA-2/AM transfectadas de forma estable con CCKAR de rata (Tarasova y col. (1997), J. Biol. Chem. 272:14817). Se midió la inhibición de la unión de ligandos usando un agonista fluorescente, el verde de rodamina CCK-8 (RG-CCK-8) y microscopía de barrido láser confocal cuantitativo (Tarasova y col. (1997), J. Biol. Chem. 272:14817). Los péptidos derivados del primer, segundo y sexto dominios de transmembrana inhibían la señalización inducida por CCK a través del receptor CCKAR. Los péptidos derivados del primer y segundo dominios de transmembrana, CCKAR-1-1 y CCKAR-2-1, tenían potencias comparables con respecto a la inhibición de la señalización y unión de ligandos. Un péptido derivado del sexto dominio de transmembrana, CCKAR-6-1, era activo en la inhibición de la señalización, pero tenía una muy baja actividad en la inhibición de la unión de RG-CCK-8.

TABLA 4

La actividad de péptidos TM derivados de CCKAR en la inhibición de la liberación de calcio intracelular inducida por CCK-8 y la unión de RG-CCK-8

Péptido	Concentración requerida para la inhibición de la señalización	CI ₅₀ en la inhibición de la unión de RG-CCK-8
CCKAR-1-6: DDEWQSALQILLYSIIFLLSVGNTLVITV*	50 μ M	20 μ M
CCKAR-2-1: FLLSLAVSDLMLCLFCMPFNLP	2 μ M	0,5 μ M
CCKAR-4-2 (#71) VIAATWCLSFTIMTPYPIYSNLVPFTDD	> 50 μ M	> 50 μ M
CCKAR-5-3 (#45) DDQTFLLLILFLLPGIVMVVAYGL*	> 50 μ M	> 50 μ M
CCKAR-6-4 (#77) IVVLFFLCWMPIFSANAWRAYDTVDD	5 μ M	> 50 μ M

* No un péptido de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula moduladora de los receptores copulados a proteína G (GPCR) aislada consistente en un péptido o
 5 peptidomimético de 5 a 50 aminoácidos que es un análogo estructural de un dominio de transmembrana de un GPCR, donde

dicha molécula tiene un extremo N y un extremo C y dicha molécula tiene un extremo extracelular que está
 negativamente cargado y un extremo intracelular que tiene carga neutra en condiciones fisiológicas, y donde

10 dicha molécula tiene un grupo carboxilo C-terminal amidado cuando dicho extremo C tiene carga neutra, y, cuando

dicho extremo intracelular es dicho extremo N, dicho péptido o peptidomimético incluye al menos cuatro de los
 15 cinco primeros aminoácidos N-terminales que tienen cadenas laterales de aminoácidos de carga neutra en condiciones fisiológicas;

dicha molécula se inserta espontáneamente en una membrana en la misma orientación que el dominio GPCR de
 transmembrana del que deriva; y

20 dicha molécula modula una propiedad o actividad biológica de dicho GPCR alterando la estructura o la organiza-
 ción de dicho GPCR.

2. Una molécula de la Reivindicación 1, donde la carga negativa del extremo extracelular de la molécula es aportada
 25 por de uno a tres residuos de ácido que son ácidos en condiciones fisiológicas.

3. Una molécula de la Reivindicación 1, donde la carga negativa del extremo extracelular de la molécula es aportada
 por un grupo carboxilo, fosfato, borato, sulfonato o sulfato.

30 4. Una molécula moduladora de los receptores copulados a proteína G (GPCR) aislada consistente en un péptido o
 peptidomimético que es un análogo estructural de una porción de un dominio de transmembrana de CXCR4,

donde dicha porción de dicho dominio de transmembrana tiene una secuencia seleccionada entre:

35

LLFVITLPFWAVDAVANWYFGNDD,

40 LLFVITLPFWAVDAVANDD-OH,

VYVGWIPALLLTPDFEFANDD-OH,

VILILAFFACWLPYYIGISID-OH,

45 DDEALAFFHCCLNPILYAFL-NH₂,

y

DDSITEALAFFHCCLNPILYAFL-NH₂,

50

y donde dicha molécula modula una actividad biológica de dicho CXCR4.

55 5. Una molécula moduladora de los receptores copulados a proteína G (GPCR) de la Reivindicación 4, donde
 la actividad CXCR4 modulada por dicho péptido es la inhibición de la liberación de Ca²⁺ intracelular mediada por
 CXCR4 o la inhibición de la infección por VIH mediada por CXCR4.

60 6. Una molécula de la Reivindicación 1, 2 ó 3 para uso en un método terapéutico consistente en modular una
 actividad biológica de un GPCR diana por contacto de una célula que expresa dicho GPCR con dicha molécula.

7. Una molécula de la Reivindicación 6, donde la concentración de la molécula es de aproximadamente 0,01 a
 aproximadamente 100 micromolar.

65 8. Una molécula de la Reivindicación 1, 6 ó 7, donde la molécula inhibe una propiedad o actividad biológica del
 GPCR.

9. Una molécula de la Reivindicación 8, que consiste en un péptido o peptidomimético que es un análogo estructural de una porción de un dominio de transmembrana de un GPCR, seleccionado entre:

del GPCR CXCR4:

F-2-2: LLFVITLPFWAVDAVANWYFGNDD,

F-2-5: LLFVITLPFWAVDAVANDD-OH,

F-4-2: VYVGWIPALLLTIPDFIFANDD-OH,

F-6-1: VILILAFFACWLPYYIGISID-OH,

F-7-3: DDEALAFFHCCLNPILYAFL-NH₂ y

F-7-4: DDSITEALAFFHCCLNPILYAFL-NH₂;

del GPCR CCR5:

CCR5-TM-2-2: LFFLLTVPFWAHYAAAQWDFGDD,

CCR5-TM-4-1: FGVVTSVITWVVAVFASLPGIIFTSSDD y

CCR5-TM-6-1: LIFTIMIVYFLFWAPYNIVLLLNTFQED;

del GPCR CCR2:

CCR2-TM-2-1: IYLLNLAISDLLFLITLPLWADD-OH,

CCR2-TM-2-2: LLFLITLPLWAHSAANEWVFGNDD-OH,

CCR2-TM-4-1: FGVVTSVITWLVAVFASVPGIIFTDD y

CCR2-TM-6-1: VIFTIIVIIYFLFWTPYNIVILLNTFQED;

del GPCR CCR3:

CCR3-TM-2-1: LLFLVTLPFWIHYVRGHNWVFGDDD,

CCR3-TM-4-1: FGVITSNTWGLAVLAALPEFIFYETED y

CCR3-TM-6-1: IFVIMAVFFIFWTPYNVAILLSSYQSDD;

del GPCR CCKAR:

CCKAR-TM-2-2: FLLSLAVSDLMLCLFCMPFNLIDD y

CCKAR-TM-6-4: IVVLFFLCWMPIFSANAWRAYDTVDD.

10. Una molécula de la Reivindicación 8 ó 9, donde la actividad biológica inhibida es el flujo de iones o la translocación, la fosforilación, la síntesis o degradación de proteínas, la morfología celular, la secreción, la producción de componentes particulares tales como fosfatos solubles de inositol, la unión de un virus y posterior infección, el crecimiento tumoral, la quimiotaxis, la respuesta mitogénica, la activación del crecimiento celular, la contracción muscular, la actividad vasopresora y vasodepresora, la transmisión sináptica o la liberación de calcio intracelular.

11. Una molécula de la Reivindicación 4 para uso en una terapia consistente en modular la actividad biológica de un GPCR por contacto de una célula que expresa dicho GPCR con dicha molécula.

12. Una molécula de la Reivindicación 11, donde la concentración de la molécula es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 10 micromolar.

13. Una molécula de la Reivindicación 11, donde el GPCR diana es CXCR4 y la actividad biológica modulada es la inhibición de la infección por VIH mediada por CXCR4 o la inhibición de la liberación de Ca²⁺ intracelular mediada por CXCR4.

14. Una molécula de la Reivindicación 6, donde el GPCR es CCR5 y la actividad biológica modulada es la inhibición de la infección por VIH mediada por CCR5 o la inhibición de liberación de Ca²⁺ intracelular mediada por CCR5.

ES 2 299 242 T3

15. Una molécula de la Reivindicación 6, donde el GPCR diana es CCKAR y la actividad biológica modulada es la inhibición de la liberación de Ca^{2+} intracelular mediada por CCKAR o la inhibición del crecimiento o progresión tumoral.

16. Uso de una molécula moduladora de GPCR de la Reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para inhibir la infección por VIH-1, donde el contacto de una célula que expresa el GPCR con dicha molécula inhibe la infección por VIH-1.

17. Un uso de la Reivindicación 16, donde el péptido o peptidomimético es un análogo estructural de una porción de un dominio de transmembrana de CXCR4, CCR2, CCR3 o CCR5.

18. Un uso de la Reivindicación 17, donde se pone en contacto una célula que expresa CXCR4 con una molécula que contiene un péptido de transmembrana CXCR4 que tiene una secuencia seleccionada entre:

LLFVITLPFWAVDAVANWYFGNDD,

LLFVITLPFWAVDAVANDD-OH,

VYVGWVWIPALLLTIPDFIFANDD-OH,

VILILAFFACWLPYYIGISID-OH,

DDEALAFFHCCLNPILYAFL-NH₂,

y

DDSITEALAFFHCCLNPILYAFL-NH₂,

y donde dicha molécula es efectiva en la inhibición de la infección mediada por CXCR4 de células que expresan CXCR4 con dicha infección por VIH.

19. Uso de una molécula según se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento para un tratamiento terapéutico que consiste en modular un GPCR.

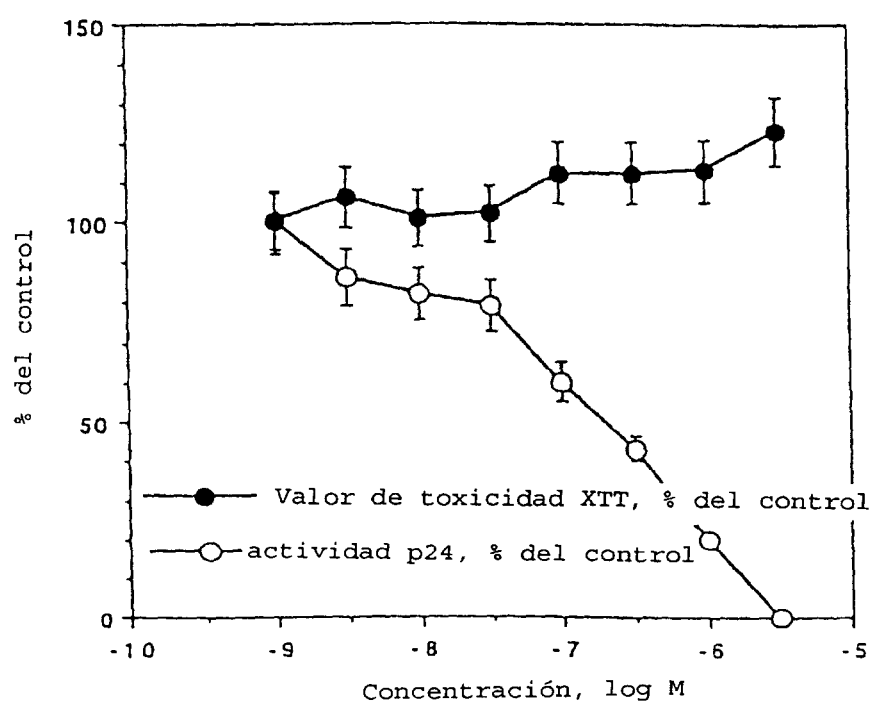


Figura 1.

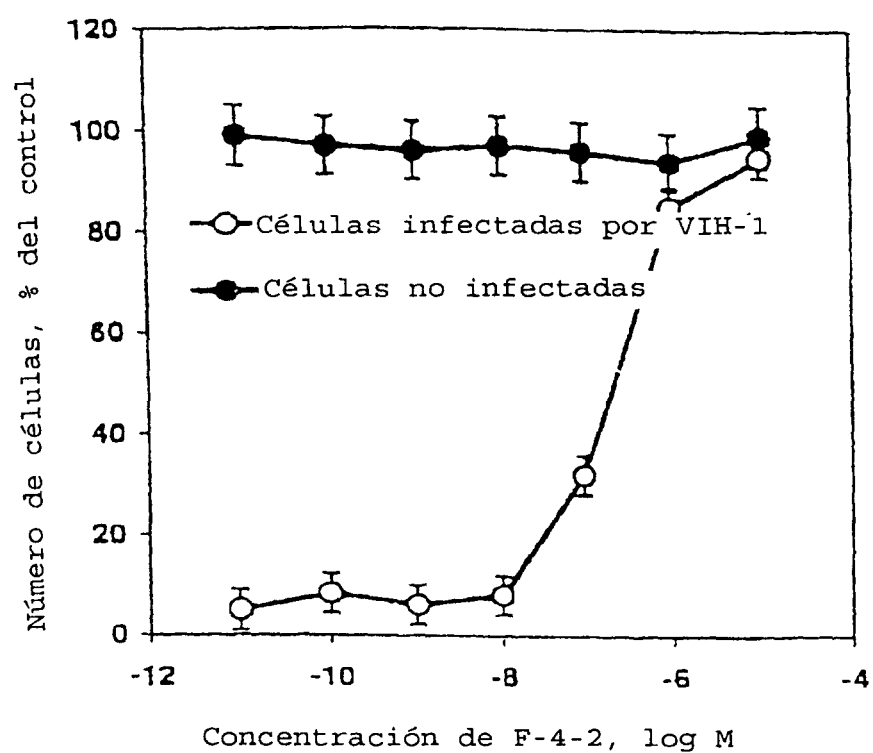


Figura 2.

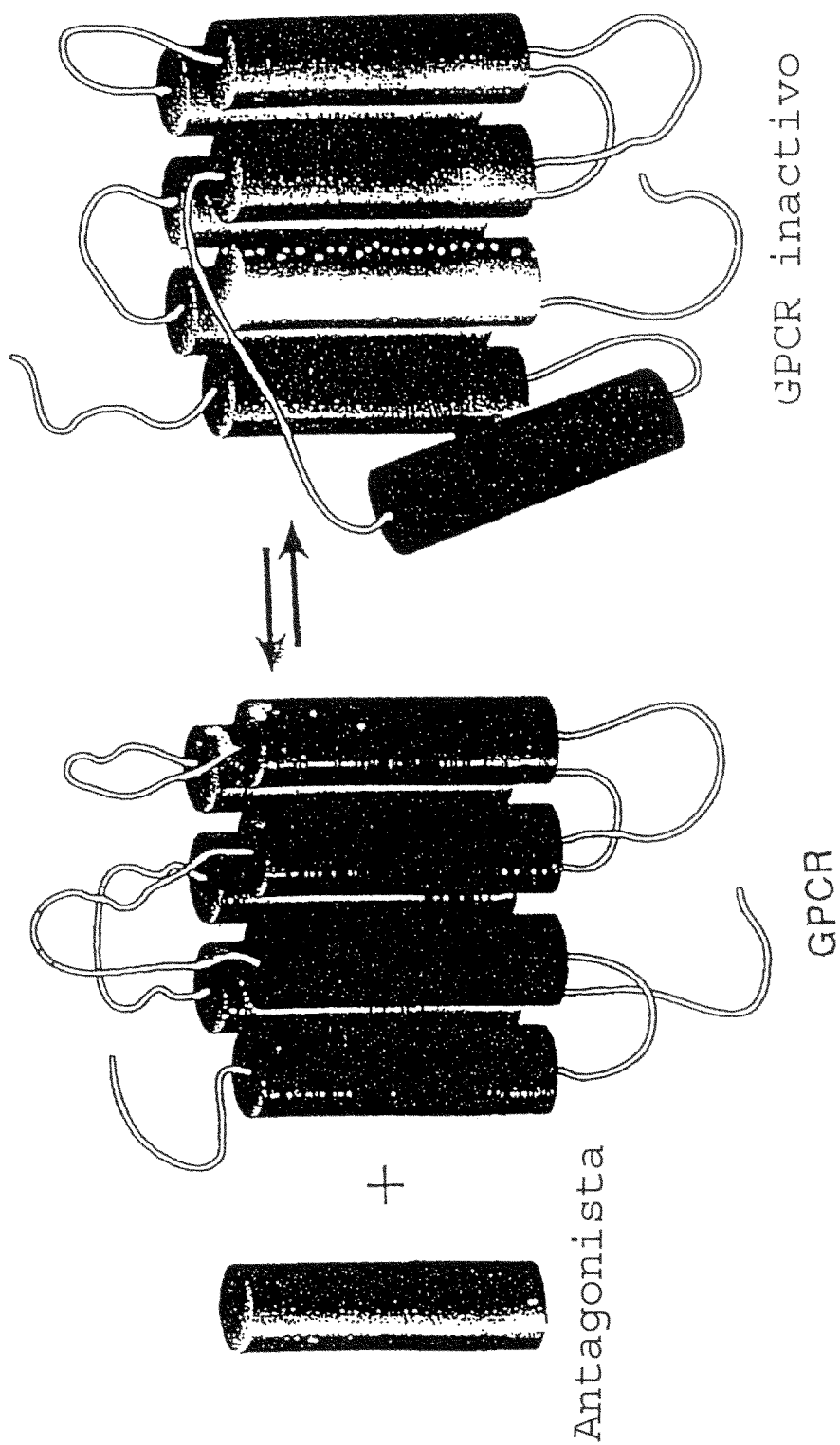


Figura 3.

ES 2 299 242 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Tarasova, Nadya I.
 Michejda, Christopher J.
 5 El Gobierno de los Estados Unidos de América representado por el Secretario del Ministerio de Salud y Servicios Humanos
 <120> Antagonistas de receptores copulados a proteína G
 <130> 015280-337100PC
 10 <140> WO PCT/US99/04438
 <141> 26-02-1999
 <150> EE.UU. 60/076.105
 15 <151> 27-02-1998
 <160> 363
 <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0
 <210> 1
 20 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> F-2-2 GPCR CXCR4
 <400> 1
 30 Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val Asp Ala Val Ala
 1 5 10 15
 Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Asp Asp
 20
 35 <210> 2
 <211> 19
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> F-2-5 GPCR CXCR4
 45 <400> 2
 Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val Asp Ala Val Ala
 1 5 10 15
 Asn Asp Asp
 50 <210> 3
 <211> 23
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> F-4-2 GPCR CXCR4
 60 <400> 3
 Val Tyr Val Gly Val Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp
 1 5 10 15
 65 Phe Ile Phe Ala Asn Asp Asp
 20

ES 2 299 242 T3

<210> 4
 <211> 21
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> F-6-1 GPCR CXCR4
 10 <400> 4
 Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr Ile
 1 5 10 15
 15 Gly Ile Ser Ile Asp
 20
 <210> 5
 <211> 20
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> F-7-3 GPCR CXCR4
 25 <221> MOD_RES
 <222> (20)...(20)
 <223> Xaa = leucinamida
 30 <400> 5
 Asp Asp Glu Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 35 Tyr Ala Phe Xaa
 20
 <210> 6
 <211> 23
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> F-7-4 GPCR CXCR4
 <221> MOD_RES
 <222> (23)...(23)
 <223> Xaa = leucinamida
 50 <400> 6
 Asp Asp Ser Ile Thr Glu Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn
 1 5 10 15
 55 Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Xaa
 20
 <210> 7
 60 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> CCR5-TM-2-2 GPCR CCR5

ES 2 299 242 T3

<400> 7

5 Leu Phe Phe Leu Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Gln Trp Asp Phe Gly Asp Asp
 20

<210> 8

10 <211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> CCR5-TM-4-1 GPCR CCR5

<400> 8

20 Phe Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala
 1 5 10 15
 Ser Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Ser Ser Asp Asp
 20 25

25

<210> 9

<211> 28

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CCR5-TM-6-1 GPCR CCR5

35

<400> 9

40 Leu Ile Phe Thr Ile Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr
 1 5 10 15
 Asn Ile Val Leu Leu Leu Asn Thr Phe Gln Glu Asp
 20 25

<210> 10

45 <211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> CCR5-TM-7-1 GPCR CCR5

<400> 10

55 Asp Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr His Cys
 1 5 10 15
 Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val
 20 25

60 <210> 11

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65

<220>

<223> CCR2-TM-2-1 GPCR CCR2

ES 2 299 242 T3

<400> 11

```

5      Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Ile Thr
      1           5           10           15
      Leu Pro Leu Trp Ala Asp Asp
                20

```

<210> 12

10 <211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> CCR2-TM-2-2 GPCR CCR2

<400> 12

```

20      Leu Leu Phe Leu Ile Thr Leu Pro Leu Trp Ala His Ser Ala Ala Asn
      1           5           10           15
      Glu Trp Val Phe Gly Asn Asp Asp
                20

```

25 <210> 13

<211> 26

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CCR2-TM-4-1 GPCR CCR2

35 <400> 13

```

      Phe Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Leu Val Ala Val Phe Ala
      1           5           10           15
40    Ser Val Pro Gly Ile Ile Phe Thr Asp Asp
                20           25

```

<210> 14

45 <211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> CCR2-TM-6-1 GPCR CCR2

<400> 14

```

55      Val Ile Phe Thr Ile Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Thr Pro Tyr
      1           5           10           15
      Asn Ile Val Ile Leu Leu Asn Thr Phe Gln Glu Asp
                20           25

```

60 <210> 15

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> CCR2-TM-7-1 GPCR CCR2

ES 2 299 242 T3

<400> 15

5 Asp Asp Ala Thr Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr His Cys Cys
1 5 10 15
Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val
20 25

<210> 16

10 $\langle 211 \rangle$ 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

15 $\langle 223 \rangle$ CCR3-TM-2-1 GPCR CCR3

<400> 16

20 Leu Leu Phe Leu Val Thr Leu Pro Phe Trp Ile His Tyr Val Arg Gly
 1 5 10 15
His Asn Trp Val Phe Gly Asp Asp Asp
 20 25

25 <210> 17

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 $\langle 220 \rangle$

<223> CCR3-TM-4-1 GPCR CCR3

<400> 17

35 Phe Gly Val Ile Thr Ser Ile Val Thr Trp Gly Leu Ala Val Leu Ala
1 5 10 15
40 Ala Leu Pro Glu Phe Ile Phe Tyr Glu Thr Glu Asp
20 25

<210> 18

<211> 28

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> CCR3-TM-6-1 GPCR CCR3

50
 $\langle 400 \rangle$ 18

<400> 18

55 Ile Phe Val Ile Met Ala Val Phe Phe Ile Phe Trp Thr Pro Tyr Asn
1 5 10 15
Val Ala Ile Leu Leu Ser Ser Tyr Gln Ser Asp Asp
20 25

<210> 19

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 $\langle 220 \rangle$

<223> CCR3-TM-7-1 GPCR CCR3

ES 2 299 242 T3

<400> 19

```

5      Asp Asp Leu Val Met Leu Val Thr Glu Val Ile Ala Tyr Ser His Cys
      1      5      10      15
      Cys Met Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Val
          20      25

```

10 <210> 20

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> CCKAR-TM-1-6 GPCR CCKAR

<400> 20

```

20      Asp Asp Glu Trp Gln Ser Ala Leu Gln Ile Leu Leu Tyr Ser Ile Ile
      1      5      10      15
      Phe Leu Leu Ser Val Leu Gly Asn Thr Leu Val Ile Thr Val
          20      25      30

```

25

<210> 21

<211> 22

<212> PRT

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CCKAR-TM-2-1 GPCR CCKAR

35

<400> 21

```

      Phe Leu Leu Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Met Leu Cys Leu Phe Cys
      1      5      10      15
40      Met Pro Phe Asn Leu Pro
          20

```

40

<210> 22

<211> 24

45

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50

<223> CCKAR-TM-2-2 GPCR CCKAR

<400> 22

```

55      Phe Leu Leu Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Met Leu Cys Leu Phe Cys
      1      5      10      15
      Met Pro Phe Asn Leu Ile Asp Asp
          20

```

55

<210> 23

60

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65

<220>

<223> CCKAR-TM-6-4 GPCR CCKAR

ES 2 299 242 T3

<400> 23

	Ile	Val	Val	Leu	Phe	Phe	Leu	Cys	Trp	Met	Pro	Ile	Phe	Ser	Ala	Asn
	1				5				10						15	
5	Ala	Trp	Arg	Ala	Tyr	Asp	Thr	Val	Asp	Asp						
				20					25							

<210> 24

<211> 43

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> GPCRAelegans GPCR TM1

<400> 24

	His	Pro	Cys	Glu	Asp	Ile	Met	Gly	Tyr	Val	Trp	Leu	Thr	Val	Val	Ser
	1				5					10					15	
20	Phe	Met	Val	Gly	Ala	Val	Ala	Leu	Val	Ala	Asn	Leu	Val	Val	Ala	Leu
				20					25					30		
	Val	Leu	Leu	Thr	Ser	Gln	Arg	Arg	Leu	Asn	Val					
			35					40								

25 <210> 25

<211> 50

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> GRH GPCR TM1

35 <400> 25

	Asn	Leu	Pro	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Lys	Ile	Arg	Val	Thr	Val	Thr
	1				5					10					15	
40	Phe	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Ala	Thr	Phe	Asn	Ala	Ser	Phe	Leu	Leu
				20					25					30		
	Lys	Leu	Gln	Lys	Trp	Thr	Gln	Lys	Lys	Glu	Lys	Gly	Lys	Lys	Leu	Ser
			35					40					45			
	Arg	Met														
45		50														

<210> 26

<211> 43

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRH GPCR TM1

55 <400> 26

	Arg	Ala	Val	Val	Ala	Leu	Glu	Tyr	Gln	Val	Val	Thr	Ile	Leu	Leu	Val
	1				5					10					15	
60	Leu	Ile	Ile	Cys	Gly	Leu	Gly	Ile	Val	Gly	Asn	Ile	Met	Val	Val	Leu
				20					25					30		
	Val	Val	Met	Arg	Thr	Lys	His	Met	Arg	Thr	Pro					
			35					40								

65 <210> 27

<211> 43

<212> PRT

ES 2 299 242 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FSHprec GPCR TM1

5

<400> 27

```

10      Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Asn Ile Leu Arg Val Leu Ile
        1          5          10          15
      Trp Phe Ile Ser Ile Leu Ala Ile Thr Gly Asn Ile Ile Val Leu Val
                20          25          30
      Ile Leu Thr Thr Ser Gln Tyr Lys Leu Thr Val
15          35          40

```

<210> 28

<211> 43

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> TSHprec GPCR TM1

<400> 28

```

30      Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Lys Phe Leu Arg Ile Val Val
        1          5          10          15
      Trp Phe Val Ser Leu Leu Ala Leu Leu Gly Asn Val Phe Val Leu Leu
                20          25          30
      Ile Leu Leu Thr Ser His Tyr Lys Leu Asn Val
35          35          40

```

<210> 29

40

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> LH_CGprec GPCR TM1

<400> 29

```

50      Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Asp Phe Leu Arg Val Leu Ile
        1          5          10          15
      Trp Leu Ile Asn Ile Leu Ala Ile Met Gly Asn Met Thr Val Leu Phe
                20          25          30
55      Val Leu Leu Thr Ser Arg Tyr Lys Leu Thr Val
        35          40

```

<210> 30

60

<211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65

<223> PGE_EP1 GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 30

```

    Pro Asn Thr Ser Ala Val Pro Pro Ser Gly Ala Ser Pro Ala Leu Pro
      1          5          10          15
5    Ile Phe Ser Met Thr Leu Gly Ala Val Ser Asn Leu Leu Ala Leu Ala
      20          25          30
    Leu Leu Ala Gln Ala Ala Gly Arg Leu Arg Arg Arg Arg Ser Ala Thr
      35          40          45
10   Thr

```

<210> 31

<211> 45

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> PGE_EP2 GPCR TM1

20 <400> 31

```

    Ser Ala Ser Leu Ser Pro Asp Arg Leu Asn Ser Pro Val Thr Ile Pro
      1          5          10          15
25   Ala Val Met Phe Ile Phe Gly Val Val Gly Asn Leu Val Ala Ile Val
      20          25          30
    Val Leu Cys Lys Ser Arg Lys Glu Gln Lys Glu Thr Thr
      35          40          45
30

```

<210> 32

<211> 45

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> PGE_EP3 GPCR TM1

40 <400> 32

```

    Gln Trp Leu Pro Pro Gly Glu Ser Pro Ala Ile Ser Ser Val Met Phe
      1          5          10          15
45   Ser Ala Gly Val Leu Gly Asn Leu Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ala Arg
      20          25          30
    Arg Trp Arg Ser Ala Gly Arg Arg Ser Ser Leu Ser Leu
      35          40          45

```

<210> 33

<211> 48

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> PGF GPCR TM1

<400> 33

```

    Ser Asn Thr Thr Cys Gln Thr Glu Asn Arg Leu Ser Val Phe Phe Ser
      1          5          10          15
60   Val Ile Phe Met Thr Val Gly Ile Leu Ser Asn Ser Leu Ala Ile Ala
      20          25          30
65   Ile Leu Met Lys Ala Tyr Gln Arg Phe Arg Gln Lys Ser Lys Ala Ser
      35          40          45

```

ES 2 299 242 T3

<210> 34

<211> 44

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> PGI GPCR TM1

10 <400> 34

	Cys	Arg	Asn	Leu	Thr	Tyr	Val	Arg	Gly	Ser	Val	Gly	Pro	Ala	Thr	Ser
	1				5					10					15	
15	Thr	Leu	Met	Phe	Val	Ala	Gly	Val	Val	Gly	Asn	Gly	Leu	Ala	Leu	Gly
			20						25					30		
	Ile	Leu	Ser	Ala	Arg	Arg	Pro	Ala	Arg	Pro	Ser	Ala				
			35					40								

20 <210> 35

<211> 47

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> TXA2 GPCR TM1

30 <400> 35

	Asn	Ile	Thr	Leu	Glu	Glu	Arg	Arg	Leu	Ile	Ala	Ser	Pro	Trp	Phe	Ala
	1				5					10					15	
35	Ala	Ser	Phe	Cys	Val	Val	Gly	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Leu	Ala	Leu	Ser
				20					25					30		
	Val	Leu	Ala	Gly	Ala	Arg	Gln	Gly	Gly	Ser	His	Thr	Arg	Ser	Ser	
			35					40					45			

40 <210> 36

<211> 46

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> PAF GPCR TM1

50 <400> 36

	His	Met	Asp	Ser	Glu	Phe	Arg	Tyr	Thr	Leu	Phe	Pro	Ile	Val	Tyr	Ser
	1				5					10					15	
55	Ile	Ile	Phe	Val	Leu	Gly	Val	Ile	Ala	Asn	Gly	Tyr	Val	Leu	Trp	Val
				20					25					30		
	Phe	Ala	Arg	Leu	Tyr	Pro	Cys	Lys	Lys	Phe	Asn	Glu	Ile	Lys		
			35					40					45			

60 <210> 37

<211> 40

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> M2 GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 37
 Tyr Lys Thr Phe Glu Val Val Phe Ile Val Leu Val Ala Gly Ser Leu
 1 5 10 15
 5 Ser Leu Val Thr Ile Ile Gly Asn Ile Leu Val Met Val Ser Ile Lys
 20 25 30
 Val Asn Arg His Leu Gln Thr Val
 35 40

10 <210> 38
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> M4 GPCR TM1

20 <400> 38
 His Asn Arg Tyr Glu Thr Val Glu Met Val Phe Ile Ala Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Ser Leu Val Thr Val Val Gly Asn Ile Leu Val Met Leu
 20 25 30
 25 Ser Ile Lys Val Asn Arg Gln Leu Gln Thr Val
 35 40

30 <210> 39
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> M1 GPCR TM1

40 <400> 39
 Gly Lys Gly Pro Trp Gln Val Ala Phe Ile Gly Ile Thr Thr Gly Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Ala Thr Val Thr Gly Asn Leu Leu Val Leu Ile Ser Phe
 20 25 30
 45 Lys Val Asn Thr Glu Leu Lys Thr Val
 35 40

50 <210> 40
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> M3 GPCR TM1

60 <400> 40
 Leu Gly Gly His Thr Val Trp Gln Val Val Phe Ile Ala Phe Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Ile Leu Ala Leu Val Thr Ile Ile Gly Asn Ile Leu Val Ile Val
 20 25 30
 Ser Phe Lys Val Asn Lys Gln Leu Lys Thr Val
 35 40

65 <210> 41
 <211> 43

ES 2 299 242 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> M5 GPCR TM1

<400> 41

```

10      Leu Glu Arg His Arg Leu Trp Glu Val Ile Thr Ile Ala Ala Val Thr
        1          5          10          15
      Ala Val Val Ser Leu Ile Thr Ile Val Gly Asn Val Leu Val Met Ile
                20          25          30
15      Ser Phe Lys Val Asn Ser Gln Leu Lys Thr Val
          35          40

```

<210> 42

20 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> H1 GPCR TM1

<400> 42

```

30      Lys Thr Thr Met Ala Ser Pro Gln Leu Met Pro Leu Val Val Val Leu
        1          5          10          15
      Ser Thr Ile Cys Leu Val Thr Val Gly Leu Asn Leu Leu Val Leu Tyr
                20          25          30
35      Ala Val Arg Ser Glu Arg Lys Leu His Thr Val
          35          40

```

<210> 43

40 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> H2 GPCR TM1

<400> 43

```

50      Phe Cys Leu Asp Ser Thr Ala Cys Lys Ile Thr Ile Thr Val Val Leu
        1          5          10          15
      Ala Val Leu Ile Leu Ile Thr Val Ala Gly Asn Val Val Val Cys Leu
                20          25          30
55      Ala Val Gly Leu Asn Arg Arg Leu Arg Asn Leu
          35          40

```

60 <210> 44

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> 5HT1A GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 44

```

5      Ile Ser Asp Val Thr Val Ser Tyr Gln Val Ile Thr Ser Leu Leu Leu
      1      5      10      15
      Gly Thr Leu Ile Phe Cys Ala Val Leu Gly Asn Ala Cys Val Val Ala
      20      25      30
      Ala Ile Ala Leu Glu Arg Ser Leu Gln Asn Val
10      35      40

```

<210> 45

<211> 43

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> 5HT1B GPCR TM1

<400> 45

```

25      Gln Asp Ser Ile Ser Leu Pro Trp Lys Val Leu Leu Val Met Leu Leu
      1      5      10      15
      Ala Leu Ile Thr Leu Ala Thr Thr Leu Ser Asn Ala Phe Val Ile Ala
      20      25      30
      Thr Val Tyr Arg Thr Arg Lys Leu His Thr Pro
30      35      40

```

<210> 46

35 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> 5HT1D GPCR TM1

<400> 46

```

45      Asp Pro Arg Thr Leu Gln Ala Leu Lys Ile Ser Leu Ala Val Val Leu
      1      5      10      15
      Ser Val Ile Thr Leu Ala Thr Val Leu Ser Asn Ala Phe Val Leu Thr
50      20      25      30

```

```

55      Thr Ile Leu Leu Thr Arg Lys Leu His Thr Pro
      35      40

```

<210> 47

60 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> 5HT1E GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 47

```

      Ile Arg Pro Lys Thr Ile Thr Glu Lys Met Leu Ile Cys Met Thr Leu
      1           5           10           15
5      Val Val Ile Thr Thr Leu Thr Thr Leu Leu Asn Leu Ala Val Ile Met
      20           25           30
      Ala Ile Gly Thr Thr Lys Lys Leu His Gln Pro
      35           40

```

<210> 48

<211> 43

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 5HT1F GPCR TM1

20 <400> 48

```

      Glu Leu Leu Asn Arg Met Pro Ser Lys Ile Leu Val Ser Leu Thr Leu
      1           5           10           15
25      Ser Gly Leu Ala Leu Met Thr Thr Thr Ile Asn Ser Leu Val Ile Ala
      20           25           30
      Ala Ile Ile Val Thr Arg Lys Leu His His Pro
      35           40

```

<210> 49

30 <211> 37

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> 5HT2A GPCR TM1

<400> 49

```

40      Gln Glu Lys Asn Trp Ser Ala Leu Leu Thr Ala Val Val Ile Ile Leu
      1           5           10           15
      Thr Ile Ala Gly Asn Ile Leu Val Ile Met Ala Val Ser Leu Glu Lys
      20           25           30
45      Lys Leu Gln Asn Ala
      35

```

<210> 50

50 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> 5HT2B GPCR TM1

<400> 50

```

60      Ile Val Glu Glu Gln Gly Asn Lys Leu His Trp Ala Ala Leu Leu Ile
      1           5           10           15
      Leu Met Val Ile Ile Pro Thr Ile Gly Gly Asn Thr Leu Val Ile Leu
      20           25           30
65      Ala Val Ser Leu Glu Lys Lys Leu Gln Tyr Ala
      35           40

```

ES 2 299 242 T3

<210> 51
 <211> 35
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 5HT2C GPCR TM1
 10 <400> 51
 Gln Asn Trp Pro Ala Leu Ser Ile Val Ile Ile Ile Ile Met Thr Ile
 1 5 10 15
 15 Gly Gly Asn Ile Leu Val Ile Met Ala Val Ser Met Glu Lys Lys Leu
 20 25 30
 His Asn Ala
 35
 20 <210> 52
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> 5HT5A GPCR TM1
 30 <400> 52
 Ser Ser Pro Leu Leu Ser Val Phe Gly Val Leu Ile Leu Thr Leu Leu
 1 5 10 15
 35 Gly Phe Leu Val Ala Ala Thr Phe Ala Trp Asn Leu Leu Val Leu Ala
 20 25 30
 Thr Ile Leu Arg Val Arg Thr Phe His Arg Val
 35 40
 40 <210> 53
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> 5HT5Brat GPCR TM1
 50 <400> 53
 Arg Glu Pro Pro Phe Ser Ala Phe Thr Val Leu Val Val Thr Leu Leu
 1 5 10 15
 55 Val Leu Leu Ile Ala Ala Thr Phe Leu Trp Asn Leu Leu Val Leu Val
 20 25 30
 Thr Ile Leu Arg Val Arg Ala Phe His Arg Val
 35 40
 60 <210> 54
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> 5HT6rat GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 54

```

      Gly Pro Pro Pro Ala Pro Gly Gly Ser Gly Trp Val Ala Ala Ala Leu
      1      5      10      15
5      Cys Val Val Ile Val Leu Thr Ala Ala Ala Asn Ser Leu Leu Ile Val
      20      25      30
      Leu Ile Cys Thr Gln Pro Ala Val Arg Asn Thr
      35      40

```

10 <210> 55

<211> 43

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> 5HT7 GPCR TM1

20 <400> 55

```

      Gln Ile Asn Tyr Gly Arg Val Glu Lys Val Val Ile Gly Ser Ile Leu
      1      5      10      15
25      Thr Leu Ile Thr Leu Leu Thr Ile Ala Gly Asn Cys Leu Val Val Ile
      20      25      30
      Ser Val Cys Phe Val Lys Lys Leu Arg Gln Pro
      35      40

```

<210> 56

30 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> alpha1A GPCR TM1

<400> 56

```

      Gly Gly Leu Val Val Ser Ala Gln Gly Val Gly Val Gly Val Phe Leu
      1      5      10      15
45      Ala Ala Phe Ile Leu Met Ala Val Ala Gly Asn Leu Leu Val Ile Leu
      20      25      30
      Ser Val Ala Cys Asn Arg His Leu Gln Thr Val
      35      40

```

<210> 57

<211> 41

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> alpha1B GPCR TM1

<400> 57

```

      Gln Leu Asp Ile Thr Arg Ala Ile Ser Val Gly Leu Val Leu Gly Ala
      1      5      10      15
60      Phe Ile Leu Phe Ala Ile Val Gly Asn Ile Leu Val Ile Leu Ser Val
      20      25      30
      Ala Cys Asn Arg His Leu Arg Thr Pro
      35      40

```

65 <210> 58

<211> 43

ES 2 299 242 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> alpha1C GPCR TM1
 <400> 58
 10 Pro Ala Pro Val Asn Ile Ser Lys Ala Ile Leu Leu Gly Val Ile Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly Leu Ile Leu Phe Gly Val Leu Cys Asn Ile Leu Val Ile Leu
 20 25 30
 15 Ser Val Ala Cys His Arg His Leu His Ser Val
 35 40
 <210> 59
 20 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> alpha2A GPCR TM1
 <400> 59
 30 Tyr Ser Leu Gln Val Thr Leu Thr Leu Val Cys Leu Ala Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Met Leu Leu Thr Val Phe Gly Asn Val Leu Val Ile Ile Ala Val Phe
 20 25 30
 35 Thr Ser Arg Ala Leu Lys Ala Pro
 35 40
 <210> 60
 40 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> alpha2B GPCR TM1
 <400> 60
 50 Gln Asp Pro Tyr Ser Val Gln Ala Thr Ala Ala Ile Ala Ala Ala Ile
 1 5 10 15
 Thr Phe Leu Ile Leu Phe Thr Ile Phe Gly Asn Ala Leu Val Ile Leu
 20 25 30
 55 Ala Val Leu Thr Ser Arg Ser Leu Arg Ala Pro
 35 40
 60 <210> 61
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> alpha2C1 y alpha2C2 GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 61

```

    Arg Gly Gln Tyr Ser Ala Gly Ala Val Ala Gly Leu Ala Ala Val Val
      1      5      10      15
5    Gly Phe Leu Ile Val Phe Thr Val Val Gly Asn Val Leu Val Val Ile
      20      25      30

    Ala Val Leu Thr Ser Arg Ala Leu Arg Ala Pro
10      35      40

```

<210> 62

<211> 42

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> beta1 GPCR TM1

<400> 62

```

    Glu Pro Leu Ser Gln Gln Trp Thr Ala Gly Met Gly Leu Leu Met Ala
25      1      5      10      15
    Leu Ile Val Leu Leu Ile Val Ala Gly Asn Val Leu Val Ile Val Ala
      20      25      30
    Ile Ala Lys Thr Pro Arg Leu Gln Thr Leu
30      35      40

```

<210> 63

<211> 42

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> beta2 GPCR TM1

40

<400> 63

```

    Gln Gln Arg Asp Glu Val Trp Val Val Gly Met Gly Ile Val Met Ser
      1      5      10      15
45    Leu Ile Val Leu Ala Ile Val Phe Gly Asn Val Leu Val Ile Thr Ala
      20      25      30
    Ile Ala Lys Phe Glu Arg Leu Gln Thr Val
      35      40

```

50 <210> 64

<211> 43

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> beta3 GPCR TM1

60 <400> 64

```

    Gly Leu Pro Gly Val Pro Trp Glu Ala Ala Leu Ala Gly Ala Leu Leu
      1      5      10      15
65    Ala Leu Ala Val Leu Ala Thr Val Gly Gly Asn Leu Leu Val Ile Val
      20      25      30
    Ala Ile Ala Trp Thr Pro Arg Leu Gln Thr Met
      35      40

```

ES 2 299 242 T3

<210> 65
 <211> 43
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> beta4turkey GPCR TM1
 10 <400> 65

 Ser Trp Ala Ala Val Leu Ser Arg Gln Trp Ala Val Gly Ala Ala Leu
 1 5 10 15
 15 Ser Ile Thr Ile Leu Val Ile Val Ala Gly Asn Leu Leu Val Ile Val
 20 25 30
 Ala Ile Ala Lys Thr Pro Arg Leu Gln Thr Met
 35 40
 20 <210> 66
 <211> 44
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> D1A GPCR TM1
 30 <400> 66

 Val Val Glu Arg Asp Phe Ser Val Arg Ile Leu Thr Ala Cys Phe Leu
 1 5 10 15
 35 Ser Leu Leu Ile Leu Ser Thr Leu Leu Gly Asn Thr Leu Val Cys Ala
 20 25 30
 Ala Val Ile Arg Phe Arg His Leu Arg Ser Lys Val
 35 40
 40 <210> 67
 <211> 43
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> D2 GPCR TM1
 50 <400> 67

 Asp Gly Lys Ala Asp Arg Pro His Tyr Asn Tyr Tyr Ala Thr Leu Leu
 1 5 10 15
 55 Thr Leu Leu Ile Ala Val Ile Val Phe Gly Asn Val Leu Val Cys Met
 20 25 30
 Ala Val Ser Arg Glu Lys Ala Leu Gln Thr Thr
 35 40
 60 <210> 68
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> D3 GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 68

```

    Thr Gly Ala Ser Gln Ala Arg Pro His Ala Tyr Tyr Ala Leu Ser Tyr
    1      5      10      15
5    Cys Ala Leu Ile Leu Ala Ile Val Phe Gly Asn Gly Leu Val Cys Met
    20      25      30
    Ala Val Leu Lys Glu Arg Ala Leu Gln Thr Thr
    35      40

```

10 <210> 69

<211> 43

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> D4 GPCR TM1

20 <400> 69

```

    Ala Ser Ala Gly Leu Ala Gly Gln Gly Ala Ala Ala Leu Val Gly Gly
    1      5      10      15
25  Val Leu Leu Ile Gly Ala Val Leu Ala Gly Asn Ser Leu Val Cys Val
    20      25      30
    Ser Val Ala Thr Glu Arg Ala Leu Gln Thr Pro
    35      40

```

<210> 70

30 <211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> D5 GPCR TM1

<400> 70

```

    Gly Ala Pro Pro Leu Gly Pro Ser Gln Val Val Thr Ala Cys Leu Leu
    1      5      10      15
45  Thr Leu Leu Ile Ile Trp Thr Leu Leu Gly Asn Val Leu Val Cys Ala
    20      25      30
    Ala Ile Val Arg Ser Arg His Leu Arg Ala Asn Met
    35      40

```

<210> 71

<211> 43

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> A1 GPCR TM1

<400> 71

```

    Met Pro Pro Ser Ile Ser Ala Phe Gln Ala Ala Tyr Ile Gly Ile Glu
    1      5      10      15
65  Val Leu Ile Ala Leu Val Ser Val Pro Gly Asn Val Leu Val Ile Trp
    20      25      30
    Ala Val Lys Val Asn Gln Ala Leu Arg Asp Ala
    35      40

```

<210> 72

<211> 40

ES 2 299 242 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> A2a GPCR TM1
 <400> 72
 10 Met Pro Ile Met Gly Ser Ser Val Tyr Ile Thr Val Glu Leu Ala Ile
 1 5 10 15
 Ala Val Leu Ala Ile Leu Gly Asn Val Leu Val Cys Trp Ala Val Trp
 20 25 30
 15 Leu Asn Ser Asn Leu Gln Asn Val
 35 40
 20 <210> 73
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> A2b GPCR TM1
 <400> 73
 30 Met Leu Leu Glu Thr Gln Asp Ala Leu Tyr Val Ala Leu Glu Leu Val
 1 5 10 15
 Ile Ala Ala Leu Ser Val Ala Gly Asn Val Leu Val Cys Ala Ala Val
 35 20 25 30
 Gly Thr Ala Asn Thr Leu Gln Thr Pro
 35 40
 40 <210> 74
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> A3 GPCR TM1
 50 <400> 74
 Asn Ser Thr Thr Leu Ser Leu Ala Asn Val Thr Tyr Ile Thr Met Glu
 1 5 10 15
 55 Ile Phe Ile Gly Leu Cys Ala Ile Val Gly Asn Val Leu Val Ile Cys
 20 25 30
 Val Val Lys Leu Asn Pro Ser Leu Gln Thr Thr
 35 40
 60 <210> 75
 <211> 42
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> OCdrome GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 75

```

5      Leu Ala Val Pro Glu Trp Glu Ala Leu Leu Thr Ala Leu Val Leu Ser
      1          5          10          15
      Val Ile Ile Val Leu Thr Ile Ile Gly Asn Ile Leu Val Ile Leu Ser
          20          25          30
      Val Phe Thr Tyr Lys Pro Leu Arg Ile Val
10          35          40

```

<210> 76

<211> 43

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> ACTH GPCR TM1

<400> 76

```

25      Arg Asn Asn Ser Asp Cys Pro Arg Val Val Leu Pro Glu Glu Ile Phe
      1          5          10          15
      Phe Thr Ile Ser Ile Val Gly Val Leu Glu Asn Leu Ile Val Leu Leu
          20          25          30

```

30

```

35      Ala Val Phe Lys Asn Lys Asn Leu Gln Ala Pro
          35          40

```

<210> 77

<211> 43

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> MSH GPCR TM1

<400> 77

```

50      Gln Thr Gly Ala Arg Cys Leu Glu Val Ser Ile Ser Asp Gly Leu Phe
      1          5          10          15
      Leu Ser Leu Gly Leu Val Ser Leu Val Glu Asn Ala Leu Val Val Ala
          20          25          30
      Thr Ile Ala Lys Asn Arg Asn Leu His Ser Pro
55          35          40

```

<210> 78

<211> 43

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> MC3 GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 78

```

      Ser Ser Ser Ala Phe Cys Glu Gln Val Phe Ile Lys Pro Glu Ile Phe
      1      5      10      15
5      Leu Ser Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Glu Asn Ile Leu Val Ile Leu
      20      25      30
      Ala Val Val Arg Asn Gly Asn Leu His Ser Pro
      35      40

```

10 <210> 79

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> MC4 GPCR TM1

20 <400> 79

```

      Ser Asp Gly Gly Cys Tyr Glu Gln Leu Phe Val Ser Pro Glu Val Phe
      1      5      10      15
      Val Thr Leu Gly Val Ile Ser Leu Leu Glu Asn Ile Leu Val Ile Val
      20      25      30
25      Ala Ile Ala Lys Asn Lys Asn Leu His Ser Pro
      35      40

```

<210> 80

<211> 43

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> MC5 GPCR TM1

<400> 80

```

      Asn Lys Ser Ser Pro Cys Glu Asp Met Gly Ile Ala Val Glu Val Phe
      1      5      10      15
      Leu Thr Leu Gly Val Ile Ser Leu Leu Glu Asn Ile Leu Val Ile Gly
      20      25      30
      Ala Ile Val Lys Asn Lys Asn Leu His Ser Pro
      35      40
45

```

<210> 81

<211> 43

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> melatonina GPCR TM1

55 <400> 81

```

      Asp Gly Ala Arg Pro Ser Trp Leu Ala Ser Ala Leu Ala Cys Val Leu
      1      5      10      15
      Ile Phe Thr Ile Val Val Asp Ile Leu Gly Asn Leu Leu Val Ile Leu
      20      25      30
      Ser Val Tyr Arg Asn Lys Lys Leu Arg Asn Ala
      35      40

```

65 <210> 82

<211> 41

<212> PRT

ES 2 299 242 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oxitocina GPCR TM1

5

<400> 82

10	Arg	Arg	Asn	Glu	Ala	Leu	Ala	Arg	Val	Glu	Val	Ala	Val	Leu	Cys	Leu
	1				5					10				15		
	Ile	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Ser	Gly	Asn	Ala	Cys	Val	Leu	Leu	Ala	Leu
				20				25						30		
	Arg	Thr	Thr	Arg	Gln	Lys	His	Ser	Arg							
15			35					40								

<210> 83

<211> 43

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> conopressinLs GPCR TM1

25

<400> 83

30	Phe	His	Gly	Val	Asp	Glu	Asp	Leu	Leu	Lys	Ile	Glu	Ile	Ala	Val	Gln
	1				5					10				15		
	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Met	Thr	Leu	Phe	Gly	Asn	Gly	Ile	Val	Leu	Leu
				20				25						30		
	Val	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Gln	Lys	Leu	Thr	Arg					
35			35					40								

<210> 84

40 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> V1A GPCR TM1

<400> 84

50

	Arg	Asp	Val	Arg	Asn	Glu	Glu	Leu	Ala	Lys	Leu	Glu	Ile	Ala	Val	Leu
	1				5					10				15		
	Ala	Val	Thr	Phe	Ala	Val	Ala	Val	Leu	Gly	Asn	Ser	Ser	Val	Leu	Leu
				20				25						30		
55	Ala	Leu	His	Arg	Thr	Pro	Arg	Lys	Thr	Ser	Arg					
			35					40								

<210> 85

60 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65

<223> V1B GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 85

	Trp	Leu	Gly	Arg	Asp	Glu	Glu	Leu	Ala	Lys	Val	Glu	Ile	Gly	Val	Leu
	1				5					10					15	
5	Ala	Thr	Val	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Gly	Asn	Leu	Ala	Val	Leu	Leu
				20					25					30		
	Thr	Leu	Gly	Gln	Leu	Gly	Arg	Lys	Arg	Ser	Arg					
			35					40								

<210> 86
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> V2 GPCR TM1

<400> 86

20	Leu	Asp	Thr	Arg	Asp	Pro	Leu	Leu	Ala	Arg	Ala	Glu	Leu	Ala	Leu	Leu
	1				5					10					15	
	Ser	Ile	Val	Phe	Val	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Asn	Gly	Leu	Val	Leu	Ala
				20					25					30		
25	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	Gly	Arg	Arg	Gly	His	Trp	Ala	Pro			
			35					40					45			

<210> 87
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CCK_A GPCR TM1

<400> 87

40	Pro	Arg	Pro	Ser	Lys	Glu	Trp	Gln	Pro	Ala	Val	Gln	Ile	Leu	Leu	Tyr
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	Ser	Val	Leu	Gly	Asn	Thr	Leu	Val	Ile	Thr
				20					25					30		
45	Val	Leu	Ile	Arg	Asn	Lys	Arg	Met	Arg	Thr	Val					
			35					40								

<210> 88
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CCK_B GPCR TM1

<400> 88

60	Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	Glu	Leu	Glu	Leu	Ala	Ile	Arg	Ile	Thr	Leu	Tyr
	1				5					10					15	
	Ala	Val	Ile	Phe	Leu	Met	Ser	Val	Gly	Gly	Asn	Met	Leu	Ile	Ile	Val
				20					25					30		
	Val	Leu	Gly	Leu	Ser	Arg	Arg	Leu	Arg	Thr	Val					
65			35					40								

<210> 89
 <211> 43

ES 2 299 242 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> NPY1 GPCR TM1

<400> 89

```

10      Asp Cys His Leu Pro Leu Ala Met Ile Phe Thr Leu Ala Leu Ala Tyr
        1          5          10          15
        Gly Ala Val Ile Ile Leu Gly Val Ser Gly Asn Leu Ala Leu Ile Ile
                20          25          30
15      Ile Ile Leu Lys Gln Lys Glu Met Arg Asn Val
        35          40

```

<210> 90

<211> 46

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> NTR GPCR TM1

<400> 90

```

30      Asp Val Asn Thr Asp Ile Tyr Ser Lys Val Leu Val Thr Ala Val Tyr
        1          5          10          15
        Leu Ala Leu Phe Val Val Gly Thr Val Gly Asn Thr Val Thr Ala Phe
                20          25          30
35      Thr Leu Ala Arg Lys Lys Ser Leu Gln Ser Leu Gln Ser Thr
        35          40          45

```

<210> 91

<211> 43

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> NK1 GPCR TM1

<400> 91

```

50      Gln Phe Val Gln Pro Ala Trp Gln Ile Val Leu Trp Ala Ala Ala Tyr
        1          5          10          15
        Thr Val Ile Val Val Thr Ser Val Val Gly Asn Val Val Val Met Trp
                20          25          30

```

55

```

      Ile Ile Leu Ala His Lys Arg Met Arg Thr Val
        35          40

```

60 <210> 92

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> NK2 GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 92

```

      Ala Phe Ser Met Pro Ser Trp Gln Leu Ala Leu Trp Ala Pro Ala Tyr
      1           5           10           15
5      Leu Ala Leu Val Leu Val Ala Val Thr Gly Asn Ala Ile Val Ile Trp
      20           25           30
      Ile Ile Leu Ala His Arg Arg Met Arg Thr Val
      35           40

```

10 <210> 93

<211> 43

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> NK3 GPCR TM1

20 <400> 93

```

      Gln Phe Val Gln Pro Ser Trp Arg Ile Ala Leu Trp Ser Leu Ala Tyr
      1           5           10           15
25     Gly Val Val Val Ala Val Ala Val Leu Gly Asn Leu Ile Val Ile Trp
      20           25           30
      Ile Ile Leu Ala His Lys Arg Met Arg Thr Val
      35           40

```

30

<210> 94

<211> 43

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> blueops GPCR TM1

40

<400> 94

```

      Tyr His Ile Ala Pro Val Trp Ala Phe Tyr Leu Gln Ala Ala Phe Met
      1           5           10           15
45     Gly Thr Val Phe Leu Ile Gly Phe Pro Leu Asn Ala Met Val Leu Val
      20           25           30
      Ala Thr Leu Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Gln Pro
      35           40

```

50 <210> 95

<211> 43

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> greenops GPCR TM1

60 <400> 95

```

      Tyr His Ile Ala Pro Arg Trp Val Tyr His Leu Thr Ser Val Trp Met
      1           5           10           15
      Ile Phe Val Val Ile Ala Ser Val Phe Thr Asn Gly Leu Val Leu Ala
      20           25           30
65     Ala Thr Met Lys Phe Lys Lys Leu Arg His Pro
      35           40

```

ES 2 299 242 T3

<210> 96
 <211> 43
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> redops GPCR TM1
 10 <400> 96

```

      Tyr His Ile Ala Pro Arg Trp Val Tyr His Leu Thr Ser Val Trp Met
      1      5      10      15
15  Ile Phe Val Val Thr Ala Ser Val Phe Thr Asn Gly Leu Val Leu Ala
      20      25      30
      Ala Thr Met Lys Phe Lys Lys Leu Arg His Pro
      35      40
  
```

20
 <210> 97
 <211> 43
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> rodopsina GPCR TM1
 30 <400> 97

```

      Tyr Tyr Leu Ala Glu Pro Trp Gln Phe Ser Met Leu Ala Ala Tyr Met
      1      5      10      15
35  Phe Leu Leu Ile Val Leu Gly Phe Pro Ile Asn Phe Leu Thr Leu Tyr
      20      25      30
      Val Thr Val Gln His Lys Lys Leu Arg Thr Pro
      35      40
  
```

40
 <210> 98
 <211> 43
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> violetopsGg GPCR TM1
 50 <400> 98

```

      Tyr His Ile Ala Pro Pro Trp Ala Phe Tyr Leu Gln Thr Ala Phe Met
      1      5      10      15
55  Gly Ile Val Phe Ala Val Gly Thr Pro Leu Asn Ala Val Val Leu Trp
      20      25      30
      Val Thr Val Arg Tyr Lys Arg Leu Arg Gln Pro
      35      40
  
```

60
 <210> 99
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> opsin_crab GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 99

	Phe	Pro	Pro	Met	Asn	Pro	Leu	Trp	Tyr	Ser	Ile	Leu	Gly	Val	Ala	Met
	1				5					10					15	
5	Ile	Ile	Leu	Gly	Ile	Ile	Cys	Val	Leu	Gly	Asn	Gly	Met	Val	Ile	Tyr
			20						25					30		
	Leu	Met	Met	Thr	Thr	Lys	Ser	Leu	Arg	Thr	Pro					
			35					40								

10 <210> 100
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> ET_Aprec GPCR TM1

20 <400> 100

	Gln	Thr	Lys	Ile	Thr	Ser	Ala	Phe	Lys	Tyr	Ile	Asn	Thr	Val	Ile	Ser
	1				5					10					15	
	Cys	Thr	Ile	Phe	Ile	Val	Gly	Met	Val	Gly	Asn	Ala	Thr	Leu	Leu	Arg
25			20						25					30		
	Ile	Ile	Tyr	Gln	Asn	Lys	Cys	Met	Arg	Asn	Gly					
			35					40								

30 <210> 101
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> ET_Bprec GPCR TM1

<400> 101

	Pro	Ile	Glu	Ile	Lys	Glu	Thr	Phe	Lys	Tyr	Ile	Asn	Thr	Val	Val	Ser
40	1				5					10					15	
	Cys	Leu	Val	Phe	Val	Leu	Gly	Ile	Ile	Gly	Asn	Ser	Thr	Leu	Leu	Arg
			20						25					30		
	Ile	Ile	Tyr	Lys	Asn	Lys	Cys	Met	Arg	Asn	Gly					
45			35					40								

50 <210> 102
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ET_Cfrog GPCR TM1
 55

<400> 102

	Arg	Ala	Lys	Ile	Arg	His	Ala	Phe	Lys	Tyr	Val	Thr	Thr	Ile	Leu	Ser
	1				5					10					15	
60	Cys	Val	Ile	Phe	Leu	Val	Gly	Ile	Val	Gly	Asn	Ser	Thr	Leu	Leu	Arg
			20						25					30		
	Ile	Ile	Tyr	Lys	Asn	Lys	Cys	Met	Arg	Asn	Gly					
65			35					40								

<210> 103
 <211> 45

ES 2 299 242 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> galanina GPCR TM1

<400> 103

```

10      Pro Leu Phe Gly Ile Gly Val Glu Asn Phe Val Thr Leu Val Val Phe
        1           5           10           15
      Gly Leu Ile Phe Ala Leu Gly Val Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Thr
        20           25           30
15      Val Leu Ala Arg Ser Lys Pro Gly Lys Pro Arg Ser Thr
        35           40           45

```

<210> 104

20 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> NMB GPCR TM1

<400> 104

```

30      Gly Thr Thr Thr Glu Leu Val Ile Arg Cys Val Ile Pro Ser Leu Tyr
        1           5           10           15
      Leu Leu Ile Ile Thr Val Gly Leu Leu Gly Asn Ile Met Leu Val Lys
        20           25           30
35      Ile Phe Ile Thr Asn Ser Ala Met Arg Ser Val
        35           40

```

40 <210> 105

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> GRP GPCR TM1

<400> 105

```

50      Asp Asp Trp Ser His Pro Gly Ile Leu Tyr Val Ile Pro Ala Val Tyr
        1           5           10           15
      Gly Val Ile Ile Leu Ile Gly Leu Ile Gly Asn Ile Thr Leu Ile Lys
        20           25           30
55      Ile Phe Cys Thr Val Lys Ser Met Arg Asn Val
        35           40

```

60 <210> 106

<211> 43

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> BRS3 GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 106

```

5      Asp Asn Ser Pro Gly Ile Glu Ala Leu Cys Ala Ile Tyr Ile Thr Tyr
      1      5      10      15
      Ala Val Ile Ile Ser Val Gly Ile Leu Gly Asn Ala Ile Leu Ile Lys
      20      25      30

```

10

```

      Val Phe Phe Lys Thr Lys Ser Met Gln Thr Val
      35      40

```

15

<210> 107

<211> 43

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> deltaOP GPCR TM1

25

<400> 107

```

      Gly Ser Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile Ala Ile Thr Ala Leu Tyr
      1      5      10      15
30    Ser Ala Val Cys Ala Val Gly Leu Leu Gly Asn Val Leu Val Met Phe
      20      25      30
      Gly Ile Val Arg Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala
      35      40

```

35

<210> 108

<211> 43

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> kappaOP GPCR TM1

45

<400> 108

```

50    Pro Ala His Ile Ser Pro Ala Ile Pro Val Ile Ile Thr Ala Val Tyr
      1      5      10      15
      Ser Val Val Phe Val Val Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val Met Phe
      20      25      30
      Val Ile Ile Arg Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala
      35      40

```

55

<210> 109

<211> 42

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> muOP GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 109

```

      Gly Ser Pro Ser Met Ile Thr Ala Ile Thr Ile Met Ala Leu Tyr Ser
      1      5      10      15
5      Ile Val Cys Val Val Gly Leu Phe Gly Asn Phe Leu Val Met Tyr Val
      20      25      30
      Ile Val Arg Tyr Thr Lys Met Lys Thr Ala
      35      40

```

10 <210> 110

<211> 43

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OPRX GPCR TM1

20 <400> 110

```

      Gly Ala Phe Leu Pro Leu Gly Leu Lys Val Thr Ile Val Gly Leu Tyr
      1      5      10      15
25      Leu Ala Val Cys Val Gly Gly Leu Leu Gly Asn Cys Leu Val Met Tyr
      20      25      30
      Val Ile Leu Arg His Thr Lys Met Lys Thr Ala
      35      40

```

30 <210> 111

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> CB1 GPCR TM1

<400> 111

```

      Phe Met Val Leu Asn Pro Ser Gln Gln Leu Ala Ile Ala Val Leu Ser
      1      5      10      15
45      Leu Thr Leu Gly Thr Phe Thr Val Leu Glu Asn Leu Leu Val Leu Cys
      20      25      30
      Val Ile Leu His Ser Arg Ser Leu Arg Cys Arg Pro
      35      40

```

50 <210> 112

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> CB2 GPCR TM1

<400> 112

```

      Tyr Met Ile Leu Ser Gly Pro Gln Lys Thr Ala Val Ala Val Leu Cys
      1      5      10      15
65      Thr Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Leu Glu Asn Val Ala Val Leu Tyr
      20      25      30
      Leu Ile Leu Ser Ser His Gln Leu Arg Arg Lys Pro
      35      40

```

ES 2 299 242 T3

<210> 113
 <211> 43
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> SSTR1 GPCR TM1
 10 <400> 113

 Thr Leu Ser Glu Gly Gln Gly Ser Ala Ile Leu Ile Ser Phe Ile Tyr
 1 5 10 15
 15 Ser Val Val Cys Leu Val Gly Leu Cys Gly Asn Ser Met Val Ile Tyr
 20 25 30
 Val Ile Leu Arg Tyr Ala Lys Met Lys Thr Ala
 35 40
 20 <210> 114
 <211> 43
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> SSTR2 GPCR TM1
 30 <400> 114

 Glu Pro Tyr Tyr Asp Leu Thr Ser Asn Ala Val Leu Thr Phe Ile Tyr
 1 5 10 15
 35 Phe Val Val Cys Ile Ile Gly Leu Cys Gly Asn Thr Leu Val Ile Tyr
 20 25 30
 Val Ile Leu Arg Tyr Ala Lys Met Lys Thr Ile
 35 40
 40 <210> 115
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> SSTR3 GPCR TM1
 50 <400> 115

 Ser Pro Ala Gly Leu Ala Val Ser Gly Val Leu Ile Pro Leu Val Tyr
 1 5 10 15
 55 Leu Val Val Cys Val Val Gly Leu Leu Gly Asn Ser Leu Val Ile Tyr
 20 25 30
 Val Val Leu Arg His Thr Ala Ser Pro Ser Val
 35 40
 60 <210> 116
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> SSTR4 GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 116

```

      Gly Asp Ala Arg Ala Ala Gly Met Val Ala Ile Gln Cys Ile Tyr Ala
      1      5      10      15
5      Leu Val Cys Leu Val Gly Leu Val Gly Asn Ala Leu Val Ile Phe Val
      20      25      30
      Ile Leu Arg Tyr Ala Lys Met Lys Thr Ala
      35      40

```

<210> 117

<211> 43

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> SSTR5 GPCR TM1

20 <400> 117

```

      Pro Ala Pro Ser Ala Gly Ala Arg Ala Val Leu Val Pro Val Leu Tyr
      1      5      10      15
25      Leu Leu Val Cys Ala Ala Gly Leu Gly Gly Asn Thr Leu Val Ile Tyr
      20      25      30
      Val Val Leu Arg Phe Ala Lys Met Lys Thr Val
      35      40

```

30 <210> 118

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> IL8A GPCR TM1

<400> 118

```

      Met Leu Glu Thr Glu Thr Leu Asn Lys Tyr Val Val Ile Ile Ala Tyr
      1      5      10      15
45      Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu Gly Asn Ser Leu Val Met Leu
      20      25      30
      Val Ile Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg Ser Val
      35      40

```

<210> 119

50 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> IL8B GPCR TM1

<400> 119

```

      Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys Tyr Phe Val Val Ile Ile Tyr
      1      5      10      15
65      Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu Gly Asn Ser Leu Val Met Leu
      20      25      30
      Val Ile Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg Ser Val
      35      40

```

ES 2 299 242 T3

<210> 120
 <211> 43
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> AT1 Y AT1brat GPCR TM1
 10 <400> 120

 Lys Ala Gly Arg His Asn Tyr Ile Phe Val Met Ile Pro Thr Leu Tyr
 1 5 10 15
 15 Ser Ile Ile Phe Val Val Gly Ile Phe Gly Asn Ser Leu Val Val Ile
 20 25 30
 Val Ile Tyr Phe Tyr Met Lys Leu Lys Thr Val
 35 40
 20
 <210> 121
 <211> 42
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> AT2 GPCR TM1
 30 <400> 121

 Gln Lys Pro Ser Asp Lys His Leu Asp Ala Ile Pro Ile Leu Tyr Tyr
 1 5 10 15
 35 Ile Ile Phe Val Ile Gly Phe Leu Val Asn Ile Val Val Val Thr Leu
 20 25 30

 Phe Cys Cys Gln Lys Gly Pro Lys Lys Val
 40 35 40
 <210> 122
 <211> 43
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> BK1 GPCR TM1
 50 <400> 122

 Ala Pro Glu Ala Trp Asp Leu Leu His Arg Val Leu Pro Thr Phe Ile
 1 5 10 15
 55 Ile Ser Ile Cys Phe Phe Gly Leu Leu Gly Asn Leu Phe Val Leu Leu
 20 25 30
 Val Phe Leu Leu Pro Arg Arg Gln Leu Asn Val
 35 40
 60 <210> 123
 <211> 43
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> BK2 GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 123

```

      Gln Val Glu Trp Leu Gly Trp Leu Asn Thr Ile Gln Pro Pro Phe Leu
      1           5           10           15
5      Trp Val Leu Phe Val Leu Ala Thr Leu Glu Asn Ile Phe Val Leu Ser
      20           25           30
      Val Phe Cys Leu His Lys Ser Ser Cys Thr Val
      35           40

```

10 <210> 124

<211> 43

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> P2Y7 GPCR TM1

20 <400> 124

```

      Pro Ser Leu Gly Val Glu Phe Ile Ser Leu Leu Ala Ile Ile Leu Leu
      1           5           10           15
25      Ser Val Ala Leu Ala Val Gly Leu Pro Gly Asn Ser Phe Val Val Trp
      20           25           30
      Ser Ile Leu Lys Arg Met Gln Lys Arg Ser Val
      35           40

```

30 <210> 125

<211> 43

<212> PRT

35 <223> Secuencia artificial

<220>

<223> P2Y6 GPCR TM1

40 <400> 125

```

      Cys Val Tyr Arg Glu Asp Phe Lys Arg Leu Leu Leu Pro Pro Val Tyr
      1           5           10           15
45      Ser Val Val Leu Val Val Gly Leu Pro Leu Asn Val Cys Val Ile Ala
      20           25           30
      Gln Ile Cys Ala Ser Arg Arg Thr Leu Thr Arg
      35           40

```

50 <210> 126

<211> 43

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> P2Y5 GPCR TM1

60 <400> 126

```

      Cys Ser Thr Glu Asp Ser Phe Lys Tyr Thr Leu Tyr Gly Cys Val Phe
      1           5           10           15
65      Ser Met Val Phe Val Leu Gly Leu Ile Ala Asn Cys Val Ala Ile Tyr
      20           25           30
      Ile Phe Thr Phe Thr Leu Lys Val Arg Asn Glu
      35           40

```

ES 2 299 242 T3

<210> 127
 <211> 43
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> P2Y4 GPCR TM1
 10 <400> 127

 Cys Trp Phe Asp Glu Asp Phe Lys Phe Ile Leu Leu Pro Val Ser Tyr
 15 1 5 10 15
 Ala Val Val Phe Val Leu Gly Leu Gly Leu Asn Ala Pro Thr Leu Trp
 20 20 25 30
 Leu Phe Ile Phe Arg Leu Arg Pro Trp Asp Ala
 20 35 40

 <210> 128
 <211> 43
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> P2Y3chick GPCR TM1
 <400> 128

 Cys Thr Phe His Glu Glu Phe Lys Gln Val Leu Leu Pro Leu Val Tyr
 35 1 5 10 15
 Ser Val Val Phe Leu Leu Gly Leu Pro Leu Asn Ala Val Val Ile Gly
 20 25 30
 Gln Ile Trp Leu Ala Arg Lys Ala Leu Thr Arg
 40 35 40

 <210> 129
 <211> 43
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> P2Y2 GPCR TM1
 50 <400> 129

 Cys Arg Phe Asn Glu Asp Phe Lys Tyr Val Leu Leu Pro Val Ser Tyr
 1 5 10 15
 Gly Val Val Cys Val Leu Gly Leu Cys Leu Asn Ala Val Gly Leu Tyr
 55 20 25 30
 Ile Phe Leu Cys Arg Leu Lys Thr Trp Asn Ala
 35 40

 <210> 130
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> P2Y1 GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 130

```

    Ala Leu Thr Lys Thr Gly Phe Gln Phe Tyr Tyr Leu Pro Ala Val Tyr
    1           5           10           15
5    Ile Leu Val Phe Ile Ile Gly Phe Leu Gly Asn Ser Val Ala Ile Trp
    20           25           30
    Met Phe Val Phe His Met Lys Pro Trp Ser Gly
    35           40

```

<210> 131

<211> 43

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> THRprec GPCR TM1

20 <400> 131

```

    Gly Tyr Leu Thr Ser Ser Trp Leu Thr Leu Phe Val Pro Ser Val Tyr
    1           5           10           15
25   Thr Gly Val Phe Val Val Ser Leu Pro Leu Asn Ile Met Ala Ile Val
    20           25           30
    Val Phe Ile Leu Lys Met Lys Val Lys Lys Pro
    35           40

```

<210> 132

30 <211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> C5a GPCR TM1

<400> 132

```

    Thr Ser Asn Thr Leu Arg Val Pro Asp Ile Leu Ala Leu Val Ile Phe
    1           5           10           15
45   Ala Val Val Phe Leu Val Gly Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Val Trp
    20           25           30
    Val Thr Ala Phe Glu Ala Lys Arg Thr Ile
    35           40

```

<210> 133

50 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> GP01mouse GPCR TM1

<400> 133

```

    Ala Glu Ser Glu Pro Glu Leu Val Val Asn Pro Trp Asp Ile Val Leu
    1           5           10           15
60   Cys Ser Ser Gly Thr Leu Ile Cys Cys Glu Asn Ala Val Val Val Leu
    20           25           30
    Ile Ile Phe His Ser Pro Ser Leu Arg Ala Pro
    35           40

```

65 <210> 134

<211> 43

ES 2 299 242 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> R334rat GPCR TM1

 <400> 134

 10 Val Glu Ser Glu Pro Glu Leu Val Val Asn Pro Trp Asp Ile Val Leu
 1 5 10 15
 Cys Ser Ser Gly Thr Leu Ile Cys Cys Glu Asn Ala Val Val Val Leu
 20 25 30
 Ile Ile Phe His Ser Pro Ser Leu Arg Ala Pro
 35 40
 15
 <210> 135
 <211> 43
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> GP21mouse GPCR TM1
 25
 <400> 135

 30 Gly Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ser Pro Arg Ala Trp Asp Val Val Leu
 1 5 10 15
 Cys Ile Ser Gly Thr Leu Val Ser Cys Glu Asn Ala Leu Val Val Ala
 20 25 30
 Ile Ile Val Gly Thr Pro Ala Phe Arg Ala Pro
 35 40
 35
 <210> 136
 <211> 43
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> GCRCmouse GPCR TM1
 45
 <400> 136

 50 Ala Glu Ser Gln Asn Pro Thr Val Lys Ala Leu Leu Ile Val Ala Tyr
 1 5 10 15
 Ser Phe Thr Ile Val Phe Ser Leu Phe Gly Asn Val Leu Val Cys His
 20 25 30
 55

 Val Ile Phe Lys Asn Gln Arg Met His Ser Ala
 35 40
 60
 <210> 137
 <211> 40
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> TXKR GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 137

```

      Gln Pro Pro Trp Ala Val Ala Leu Trp Ser Leu Ala Tyr Gly Ala Val
      1           5           10           15
5      Val Ala Val Ala Val Leu Gly Asn Leu Val Val Ile Trp Ile Val Leu
      20           25           30
      Ala His Lys Arg Met Arg Thr Val
      35           40

```

<210> 138

<211> 43

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> G10Drat GPCR TM1

20 <400> 138

```

      Met Glu Leu Asn Glu Asn Thr Lys Gln Val Val Leu Phe Val Phe Tyr
      1           5           10           15
25     Leu Ala Ile Phe Val Val Gly Leu Val Glu Asn Val Leu Val Ile Cys
      20           25           30
      Val Asn Cys Arg Arg Ser Gly Arg Val Gly Met
      35           40

```

<210> 139

<211> 44

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> RDC1 GPCR TM1

40 <400> 139

```

      Asn Met Pro Asn Lys Ser Val Leu Leu Tyr Thr Leu Ser Phe Ile Tyr
      1           5           10           15
45     Ile Phe Ile Phe Val Ile Gly Met Ile Ala Asn Ser Val Val Val Trp
      20           25           30
      Val Asn Ile Gln Ala Lys Thr Thr Gly Tyr Asp Thr
      35           40

```

<210> 140

<211> 42

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> BLR1 GPCR TM1

60 <400> 140

```

      Met Ala Ser Phe Lys Ala Val Phe Val Pro Val Ala Tyr Ser Leu Ile
      1           5           10           15
      Phe Leu Leu Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val Leu Val Ile Leu Glu
      20           25           30
65     Arg His Arg Gln Thr Arg Ser Ser Thr Glu
      35           40

```

ES 2 299 242 T3

<210> 141
 <211> 48
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CL5 Y LCR1 GPCR TM1
 10 <400> 141

	Arg	Glu	Glu	Asn	Ala	Asn	Phe	Asn	Lys	Ile	Phe	Leu	Pro	Thr	Ile	Tyr
	1				5					10					15	
15	Ser	Ile	Ile	Phe	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Gly	Asn	Gly	Leu	Val	Ile	Leu
				20				25					30			
	Val	Met	Gly	Tyr	Gln	Lys	Lys	Leu	Arg	Ser	Met	Thr	Asp	Lys	Tyr	Arg
			35					40					45			

 20 <210> 142
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> EBI1 GPCR TM1
 30 <400> 142

	Lys	Lys	Asp	Val	Arg	Asn	Phe	Lys	Ala	Trp	Phe	Leu	Pro	Ile	Met	Tyr
	1				5					10					15	
35	Ser	Ile	Ile	Cys	Phe	Val	Gly	Leu	Leu	Gly	Asn	Gly	Leu	Val	Val	Leu
				20				25					30			
	Thr	Tyr	Ile	Tyr	Phe	Lys	Arg	Leu	Lys	Thr	Met	Thr	Asp	Thr	Tyr	
			35					40					45			

 40 <210> 143
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> RBS1rat GPCR TM1
 <400> 143
 50

	Leu	Gly	Asp	Ile	Val	Ala	Phe	Gly	Thr	Ile	Phe	Leu	Ser	Ile	Phe	Tyr
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Val	Phe	Thr	Phe	Gly	Leu	Val	Gly	Asn	Leu	Leu	Val	Val	Leu
				20				25					30			
55	Ala	Leu	Thr	Asn	Ser	Arg	Lys	Ser	Lys	Ser	Ile	Thr	Asp	Ile	Tyr	
			35					40					45			

 60 <210> 144
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> EBI2 GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 144

```

      Leu Tyr Ala His His Ser Thr Ala Arg Ile Val Met Pro Leu His Tyr
      1           5           10           15
5     Ser Leu Val Phe Ile Ile Gly Leu Val Gly Asn Leu Leu Ala Leu Val
      20           25           30
      Val Ile Val Gln Asn Arg Lys Lys Ile Asn Ser Thr Thr Leu Tyr
      35           40           45

```

10 <210> 145

<211> 47

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> GCRTchick GPCR TM1

20 <400> 145

```

      Cys Ser Thr Glu Asp Ser Phe Lys Tyr Thr Leu Tyr Gly Cys Val Phe
      1           5           10           15
25    Ser Met Val Phe Val Leu Gly Leu Ile Ala Asn Cys Val Ala Ile Tyr
      20           25           30
      Ile Phe Thr Phe Thr Leu Lys Val Arg Asn Glu Thr Thr Thr Tyr
      35           40           45

```

<210> 146

30 <211> 46

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> APJ GPCR TM1

<400> 146

```

      Glu Tyr Thr Asp Trp Lys Ser Ser Gly Ala Leu Ile Pro Ala Ile Tyr
      1           5           10           15
45    Met Leu Val Phe Leu Leu Gly Thr Thr Gly Asn Gly Leu Val Leu Trp
      20           25           30
      Thr Val Phe Arg Ser Ser Arg Glu Lys Arg Arg Ser Ala Asp
      35           40           45

```

<210> 147

<211> 42

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> RTArat GPCR TM1

<400> 147

```

      Glu Gln Ile Ala Thr Leu Pro Pro Pro Ala Val Thr Asn Tyr Ile Phe
      1           5           10           15
60    Leu Leu Leu Cys Leu Cys Gly Leu Val Gly Asn Gly Leu Val Leu Trp
      20           25           30
      Phe Phe Gly Phe Ser Ile Lys Arg Thr Pro
      35           40

```

<210> 148

<211> 43

ES 2 299 242 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> UHRrat GPCR TM1

<400> 148

```

10      Ser Leu Gln Leu Val His Gln Leu Lys Gly Leu Ile Val Met Leu Tyr
        1           5           10           15
      Ser Ile Val Val Val Val Gly Leu Val Gly Asn Cys Leu Leu Val Leu
        20           25           30
15      Val Ile Ala Arg Val Arg Arg Leu His Asn Val
        35           40

```

<210> 149

20 <211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> FMRL1N GPCR TM1

<400> 149

```

30      Glu Pro Ala Gly His Thr Val Leu Trp Ile Phe Ser Leu Leu Val His
        1           5           10           15
      Gly Val Thr Phe Val Phe Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Val Ile Trp
        20           25           30
35      Val Ala Gly Phe Arg Met Thr Arg Thr Val
        35           40

```

<210> 150

40 <211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> FMRL2 GPCR TM1

<400> 150

```

50      Glu Ser Ala Gly Tyr Thr Val Leu Arg Ile Leu Pro Leu Val Val Leu
        1           5           10           15
      Gly Val Thr Phe Val Leu Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Val Ile Trp
        20           25           30
55      Val Ala Gly Phe Arg Met Thr Arg Thr Val
        35           40

```

<210> 151

60 <211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> fMLP GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 151

```

5      Val Ser Ala Gly Tyr Leu Phe Leu Asp Ile Ile Thr Tyr Leu Val Phe
      1      5      10      15
      Ala Val Thr Phe Val Leu Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Val Ile Trp
            20            25            30

```

10

```

      Val Ala Gly Phe Arg Met Thr His Thr Val
            35            40

```

15

<210> 152

<211> 43

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLF1catfish GPCR TM1

25

<400> 152

```

      Asn Gly Phe Tyr Asn Ile Pro His Thr Lys Tyr Tyr Tyr Ala Phe Leu
      1      5      10      15
30     Cys Ile Ala Tyr Ala Val Thr Val Leu Gly Asn Ser Phe Ile Met Cys
            20            25            30
      Thr Ile Tyr Leu Ala Arg Ser Leu His Thr Ala
            35            40

```

35

<210> 153

<211> 43

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLF3catfish GPCR TM1

45

<400> 153

```

      Thr Gly Leu Tyr Asn Ile Pro His Ala Lys Tyr Tyr Tyr Leu Phe Leu
      1      5      10      15
50     Cys Phe Val Tyr Thr Val Thr Phe Leu Gly Asn Ser Phe Ile Met Gly
            20            25            30
      Thr Ile Tyr Leu Ala Arg Ser Leu His Thr Ala
            35            40

```

55

<210> 154

<211> 43

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLF8catfish GPCR TM1

65

ES 2 299 242 T3

<400> 154

```

      Gly Phe His Asp Leu Gly Glu Trp Gly Pro Ile Leu Ser Ile Pro Tyr
      1      5      10      15
5      Leu Leu Met Phe Leu Leu Ser Ser Thr Ser Asn Leu Thr Leu Ile Tyr
      20      25      30
      Leu Ile Ile Ser Gln Arg Ala Leu His Ser Pro
      35      40

```

10 <210> 155

<211> 43

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLF32Acatfish GPCR TM1

20 <400> 155

```

      Ser Gly Phe Ser Gly Ile Pro Phe Ser Gln Tyr Tyr Phe Ala Phe Leu
      1      5      10      15
25      Ile Phe Ile Tyr Ile Ile Ser Leu Cys Gly Asn Ser Ile Val Leu Phe
      20      25      30
      Met Ile Leu Val Asp Arg Thr Leu His Ile Pro
      35      40

```

30 <210> 156

<211> 43

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLF32Bcatfish, OLF32Ccatfish Y OLF32Dcatfish GPCR TM1

40 <400> 156

```

      Ser Gly Phe Ser Gly Ile Pro Phe Ser Gln Tyr Tyr Phe Val Phe Leu
      1      5      10      15
45      Ile Phe Ile Tyr Ile Ile Ser Leu Cys Gly Asn Ser Ile Val Leu Phe
      20      25      30
      Met Ile Leu Val Asp Arg Thr Leu His Ile Pro
      35      40

```

50 <210> 157

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> OLF47catfish GPCR TM1

<400> 157

```

      Ile Ala Tyr Asn Ser Leu Gly Asn Lys Asn Tyr Leu Ile Leu Ala Leu
      1      5      10      15
65      Gly Ile Ile Tyr Leu Ile Thr Leu Leu Cys Asn Phe Thr Leu Leu Ala
      20      25      30
      Ile Ile Leu Met Asn Ser Ser Leu Gln Asn Pro
      35      40

```

ES 2 299 242 T3

<210> 158

<211> 43

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLF202catfish GPCR TM1

10 <400> 158

	Phe	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Val	Ser	Val	Val	Met
	1				5					10					15	
15	Phe	Phe	Val	Tyr	Val	Cys	Thr	Leu	Ile	Gly	Asn	Cys	Thr	Phe	Phe	Thr
			20					25						30		
	Leu	Phe	Leu	Arg	Glu	Lys	Ser	Leu	Gln	Lys	Pro					
			35					40								

20 <210> 159

<211> 42

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFCOR1chicken GPCR TM1

30 <400> 159

	Leu	Thr	Asp	Asn	Pro	Gly	Leu	Gln	Met	Pro	Leu	Phe	Met	Val	Phe	Leu
	1				5					10					15	
35	Ala	Ile	Tyr	Thr	Ile	Thr	Leu	Leu	Thr	Asn	Leu	Gly	Leu	Ile	Ala	Leu
			20					25						30		
	Ile	Ser	Val	Asp	Leu	His	Leu	Gln	Thr	Pro						
			35					40								

40 <210> 160

<211> 42

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFCOR2chicken GPCR TM1

50 <400> 160

	Leu	Thr	Asp	Asn	Pro	Arg	Leu	Gln	Met	Pro	Leu	Phe	Met	Val	Phe	Leu
	1				5					10					15	
55	Val	Ile	Tyr	Thr	Thr	Thr	Leu	Leu	Thr	Asn	Leu	Gly	Leu	Ile	Ala	Leu
			20					25						30		
	Ile	Gly	Met	Asp	Leu	His	Leu	Gln	Thr	Pro						
			35					40								

60 <210> 161

<211> 42

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFCOR3chicken Y OLFCOR4chicken GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 161

```

      Leu Thr Asp Asn Pro Gly Leu Gln Met Pro Leu Phe Met Val Phe Leu
      1           5           10           15
5      Ala Ile Tyr Thr Ile Thr Leu Leu Thr Asn Leu Gly Leu Ile Arg Leu
      20           25           30
      Ile Ser Val Asp Leu His Leu Gln Thr Pro
      35           40

```

10 <210> 162

<211> 42

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFCOR5chicken GPCR TM1

20 <400> 162

```

      Leu Thr Asp Asn Pro Arg Leu Gln Met Pro Leu Phe Met Val Phe Leu
      1           5           10           15
25     Ala Ile Tyr Thr Ile Thr Leu Leu Ala Asn Leu Gly Leu Ile Ala Leu
      20           25           30
      Ile Ser Val Asp Phe His Leu Gln Thr Pro
      35           40

```

<210> 163

30 <211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> OLFCOR6chicken GPCR TM1

<400> 163

```

      Leu Thr Asp Asn Pro Gly Leu Gln Met Pro Leu Phe Met Val Phe Leu
      1           5           10           15
40     Ala Ile Tyr Thr Ile Thr Leu Leu Thr Asn Leu Gly Leu Ile Ala Leu
      20           25           30
      Ile Arg Ile Asp Leu Gln Leu Gln Thr Pro
      35           40

```

<210> 164

<211> 42

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFdog GPCR TM1

55

<400> 164

```

      Leu Pro Ile Asp Pro Asp Gln Arg Asp Leu Phe Tyr Ala Leu Phe Leu
      1           5           10           15
60     Ala Met Tyr Val Thr Thr Ile Leu Gly Asn Leu Leu Ile Ile Val Leu
      20           25           30
      Ile Gln Leu Asp Ser His Leu His Thr Pro
      35           40

```

65

<210> 165

<211> 42

ES 2 299 242 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> OLF07E GPCR TM1

<400> 165

```

10      Met Ser Glu Ser Pro Glu Gln Gln Gln Ile Leu Phe Trp Met Phe Leu
        1          5          10          15
      Ser Met Tyr Leu Val Thr Val Val Gly Asn Val Leu Ile Ile Leu Ala
        20          25          30
      Ile Ser Ser Asp Ser Arg Leu His Thr Pro
15      35          40

```

<210> 166

<211> 42

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> OLF07I GPCR TM1

<400> 166

```

30      Leu Pro Ile Gln Pro Glu Gln Gln Asn Leu Cys Tyr Ala Leu Phe Leu
        1          5          10          15
      Ala Met Tyr Leu Thr Thr Leu Leu Gly Asn Leu Leu Ile Ile Val Leu
        20          25          30

35      Ile Arg Leu Asp Ser His Leu His Thr Pro
        35          40

```

40 <210> 167

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> OLF07J GPCR TM1

<400> 167

```

50      Phe Ser Ser Phe His Glu Gln Gln Ile Thr Leu Phe Gly Val Phe Leu
        1          5          10          15
      Ala Leu Tyr Ile Leu Thr Leu Ala Gly Asn Ile Ile Ile Val Thr Ile
        20          25          30
55      Ile Arg Ile Asp Leu His Leu His Thr Pro
        35          40

```

<210> 168

60 <211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> OLFOR3mouse GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 168

```

Val Ser Asp His Pro His Leu Glu Ile Ile Phe Phe Ala Val Ile Leu
 1      5      10      15
5  Ala Ser Tyr Leu Leu Thr Leu Val Gly Asn Leu Thr Ile Ile Leu Leu
    20      25      30
    Ser Arg Leu Asp Ala Arg Leu His Thr Pro
      35      40

```

10 <210> 169

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> OLFrat GPCR TM1

20 <400> 169

```

Leu Thr Lys Gln Pro Glu Leu Leu Leu Pro Leu Phe Phe Leu Phe Leu
 1      5      10      15
Val Ile Tyr Val Leu Thr Val Val Gly Asn Leu Gly Met Ile Leu Leu
    20      25      30
25  Ile Ile Val Ser Pro Leu Leu His Thr Pro
    35      40

```

<210> 170

<211> 42

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> OLFF3rat GPCR TM1

<400> 170

```

Phe Val Glu Asn Lys Asp Leu Gln Pro Leu Ile Tyr Gly Leu Phe Leu
 1      5      10      15
Ser Met Tyr Leu Val Thr Val Ile Gly Asn Ile Ser Ile Ile Val Ala
    20      25      30
45  Ile Ile Ser Asp Pro Cys Leu His Thr Pro
    35      40

```

<210> 171

<211> 42

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFF5rat GPCR TM1

55 <400> 171

```

Leu Ser Arg Gln Pro Gln Gln Gln Gln Leu Leu Phe Leu Leu Phe Leu
 1      5      10      15
Ile Met Tyr Leu Ala Thr Val Leu Gly Asn Leu Leu Ile Ile Leu Ala
    20      25      30
    Ile Gly Thr Asp Ser Arg Leu His Thr Pro
      35      40

```

65 <210> 172

<211> 42

<212> PRT

ES 2 299 242 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFF6rat GPCR TM1

5

<400> 172

10	Phe	Pro	Gly	Pro	Arg	Ser	Met	Arg	Ile	Gly	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Leu
	1				5					10					15	
	Val	Met	Tyr	Leu	Leu	Thr	Val	Val	Gly	Asn	Leu	Ala	Ile	Ile	Ser	Leu
				20					25					30		
	Val	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Leu	Gln	Thr	Pro						
15			35					40								

<210> 173

<211> 42

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFF12rat GPCR TM1

25

<400> 173

30	Phe	Thr	Glu	Asn	Pro	Gln	Leu	His	Phe	Leu	Ile	Phe	Ala	Leu	Phe	Leu
	1				5					10					15	
	Ser	Met	Tyr	Leu	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Asn	Leu	Leu	Ile	Ile	Met	Ala
				20					25					30		
	Ile	Ile	Thr	Gln	Ser	His	Leu	His	Thr	Pro						
35			35					40								

<210> 174

<211> 42

<212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFI3rat GPCR TM1

45

<400> 174

50	Leu	Pro	Ile	Pro	Glu	Glu	His	Gln	His	Leu	Phe	Tyr	Ala	Leu	Phe	Leu
	1				5					10					15	
	Val	Met	Tyr	Leu	Thr	Thr	Ile	Leu	Gly	Asn	Leu	Leu	Ile	Ile	Val	Leu
				20					25					30		
	Val	Gln	Leu	Asp	Ser	Gln	Leu	His	Thr	Pro						
55			35					40								

<210> 175

<211> 42

<212> PRT

60

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFI7rat GPCR TM1

65

<221> MOD_RES

<222> (18)...(18)

<223> Xaa = aminoácido desconocido

ES 2 299 242 T3

<400> 175

```

      Phe Pro Ala Pro Ala Pro Leu Arg Val Leu Leu Phe Phe Leu Ser Leu
      1           5           10           15
5      Leu Xaa Tyr Val Leu Val Leu Thr Glu Asn Met Leu Ile Ile Ile Ala
      20           25           30
      Ile Arg Asn His Pro Thr Leu His Lys Pro
      35           40

```

10 <210> 176

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> OLFI8rat GPCR TM1

20 <400> 176

```

      Leu Pro Ile Pro Pro Glu His Gln Gln Leu Phe Phe Ala Leu Phe Leu
      1           5           10           15
      Ile Met Tyr Leu Thr Thr Phe Leu Gly Asn Leu Leu Ile Val Val Leu
      20           25           30
25      Val Gln Leu Asp Ser His Leu His Thr Pro
      35           40

```

<210> 177

30 <211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> OLFI9rat GPCR TM1

<400> 177

```

      Leu Pro Phe Pro Pro Glu Tyr Gln His Leu Phe Tyr Ala Leu Phe Leu
      1           5           10           15
      Ala Met Tyr Leu Thr Thr Leu Leu Gly Asn Leu Ile Ile Ile Ile Leu
      20           25           30

```

45

```

      Ile Leu Leu Asp Ser His Leu His Thr Pro
      35           40

```

50 <210> 178

<211> 42

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFI14rat GPCR TM1

60 <400> 178

```

      Leu Pro Ile Pro Ser Glu Tyr His Leu Leu Phe Tyr Ala Leu Phe Leu
      1           5           10           15
      Ala Met Tyr Leu Thr Ile Ile Leu Gly Asn Leu Leu Ile Ile Val Leu
      20           25           30
65      Val Arg Leu Asp Ser His Leu His Met Pro
      35           40

```

ES 2 299 242 T3

<210> 179

<211> 42

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFI15rat GPCR TM1

10 <400> 179

```

      Leu Pro Ile Pro Ser Glu His Gln His Val Phe Tyr Ala Leu Phe Leu
      1      5      10      15
15    Ser Met Tyr Leu Thr Thr Val Leu Gly Asn Leu Ile Ile Ile Ile Leu
      20      25      30
      Ile His Leu Asp Ser His Leu His Thr Pro
      35      40

```

20 <210> 180

<211> 42

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFOR17_40 GPCR TM1

30 <400> 180

```

      Leu Leu Glu Ala Pro Gly Leu Gln Pro Val Val Phe Val Leu Phe Leu
      1      5      10      15
35    Phe Ala Tyr Leu Val Thr Val Arg Gly Asn Leu Ser Ile Leu Ala Ala
      20      25      30
      Val Leu Val Glu Pro Lys Leu His Thr Pro
      35      40

```

40 <210> 181

<211> 39

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> GUST27rat GPCR TM1

50 <400> 181

```

      Met Ile Leu Asn Cys Asn Pro Phe Ser Gly Leu Phe Leu Ser Met Tyr
      1      5      10      15
55    Leu Val Thr Val Leu Gly Asn Leu Leu Ile Ile Leu Ala Val Ser Ser
      20      25      30
      Asn Ser His Leu His Asn Leu
      35

```

60 <210> 182

<211> 43

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> RPE GPCR TM1

ES 2 299 242 T3

<400> 182

```

      Pro Thr Gly Phe Gly Glu Leu Glu Val Leu Ala Val Gly Met Val Leu
      1      5      10      15
5      Leu Val Glu Ala Leu Ser Gly Leu Ser Leu Asn Thr Leu Thr Ile Phe
      20      25      30
      Ser Phe Cys Lys Thr Pro Glu Leu Arg Thr Pro
      35      40

```

10 <210> 183
 <211> 43
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HHRF1 GPCR TM1

20 <400> 183

```

      Phe Thr Asp Val Leu Asn Gln Ser Lys Pro Val Thr Leu Phe Leu Tyr
      1      5      10      15
25      Gly Val Val Phe Leu Phe Gly Ser Ile Gly Asn Phe Leu Val Ile Phe
      20      25      30
      Thr Ile Thr Trp Arg Arg Arg Ile Gln Cys Ser
      35      40

```

30 <210> 184
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> HHRF2 GPCR TM1

<400> 184

```

40      Asn Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Leu Phe Glu Tyr Thr Arg Leu Gly Val
      1      5      10      15
      Trp Leu Met Cys Ile Val Gly Thr Phe Leu Asn Val Leu Val Ile Thr
      20      25      30
45      Thr Ile Leu Tyr Tyr Arg Arg Lys Lys Lys Ser Pro
      35      40

```

<210> 185
 <211> 45
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> HHRF3 GPCR TM1

<400> 185

```

60      Met Thr Gly Pro Leu Phe Ala Ile Arg Thr Thr Glu Ala Val Leu Asn
      1      5      10      15
      Thr Phe Ile Ile Phe Val Gly Gly Pro Leu Asn Ala Ile Val Leu Ile
      20      25      30
      Thr Gln Leu Leu Thr Asn Arg Val Leu Gly Tyr Ser Thr
      35      40      45
65

```

<210> 186
 <211> 41

ES 2 299 242 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> MCP-1A Y MCP-1B GPCR TM1

<400> 186

```

10      Asp Val Lys Gln Ile Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu
        1           5           10           15
      Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn Met Leu Val Val Leu Ile Leu
                20           25           30
15      Ile Asn Cys Lys Lys Leu Lys Cys Leu
                35           40

```

<210> 187

20 <211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> PPR1bovine GPCR TM1

<400> 187

```

30      Glu Val Arg Lys Phe Ala Lys Val Phe Leu Pro Ala Phe Phe Thr Ile
        1           5           10           15
      Ala Phe Ile Ile Gly Leu Ala Gly Asn Ser Thr Val Val Ala Ile Tyr
                20           25           30
35      Ala Tyr Tyr Lys Lys Arg Arg Thr Lys
                35           40

```

40 <210> 188

<211> 50

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> GPCRAelegans GPCR TM2

<400> 188

```

50      Thr Arg Phe Leu Met Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Phe Ile Leu Gly
        1           5           10           15
      Leu Tyr Ile Phe Ile Leu Thr Ser Val Ser Ala Val Thr Arg Gly Asp
                20           25           30
55      Tyr His Asn Tyr Val Gln Gln Trp Gln Asn Gly Ala Gly Cys Lys Ile
                35           40           45
      Leu Gly
        50

```

60 <210> 189

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> GRH GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 189

```

5      Lys Leu Leu Leu Lys His Leu Thr Leu Ala Asn Leu Leu Glu Thr Leu
      1      5      10      15
      Ile Val Met Pro Leu Asp Gly Met Trp Asn Ile Thr Val Gln Trp Tyr
      20      25      30
      Ala Gly Glu Leu Leu Cys Lys Val Leu Ser
      35      40

```

<210> 190

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TRH GPCR TM2

<400> 190

```

25      Thr Asn Cys Tyr Leu Val Ser Leu Ala Val Ala Asp Leu Met Val Leu
      1      5      10      15
      Val Ala Ala Gly Leu Pro Asn Ile Thr Asp Ser Ile Tyr Gly Ser Trp
      20      25      30
      Val Tyr Gly Tyr Val Gly Cys Leu Cys Ile Thr
      35      40

```

<210> 191

<211> 50

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FSHprec GPCR TM2

<400> 191

```

45      Pro Arg Phe Leu Met Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Leu Cys Ile Gly
      1      5      10      15
      Ile Tyr Leu Leu Leu Ile Ala Ser Val Asp Ile His Thr Lys Ser Gln
      20      25      30
      Tyr His Asn Tyr Ala Ile Asp Trp Gln Thr Gly Ala Gly Cys Asp Ala
      35      40      45
      Ala Gly
      50

```

<210> 192

<211> 50

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TSHprec GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 192

Pro Arg Phe Leu Met Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Phe Cys Met Gly
1 5 10 15

5

Met Tyr Leu Leu Leu Ile Ala Ser Val Asp Leu Tyr Thr His Ser Glu
20 25 30
Tyr Tyr Asn His Ala Ile Asp Trp Gln Thr Gly Pro Gly Cys Asn Thr
35 40 45
Ala Gly
50

10

15

<210> 193

<211> 50

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LH_CGprec GPCR TM2

25

<400> 193

Pro Arg Phe Leu Met Cys Asn Leu Ser Phe Ala Asp Phe Cys Met Gly
1 5 10 15
Leu Tyr Leu Leu Leu Ile Ala Ser Val Asp Ser Gln Thr Lys Gly Gln
20 25 30
Tyr Tyr Asn His Ala Ile Asp Trp Gln Thr Gly Ser Gly Cys Ser Thr
35 40 45
Ala Gly
50

30

35

<210> 194

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> PGE_EP1 GPCR TM2

<400> 194

50

Phe Leu Leu Phe Val Ala Ser Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ala Gly His
1 5 10 15
Val Ile Pro Gly Ala Leu Val Leu Arg Leu Tyr Thr Ala Gly Arg Ala
20 25 30
Pro Ala Gly Gly Ala Cys His Phe Leu Gly
35 40

55

<210> 195

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65

<220>

<223> PGE_EP2 GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 195

```

      Phe Tyr Thr Leu Val Cys Gly Leu Ala Val Thr Asp Leu Leu Gly Thr
      1          5          10          15
5     Leu Leu Val Ser Pro Val Thr Ile Ala Thr Tyr Met Lys Gly Gln Trp
      20          25          30
      Pro Gly Gly Gln Pro Leu Cys Glu Tyr Ser Thr
      35          40

```

10 <210> 196

<211> 47

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> PGE_EP3 GPCR TM2

20 <400> 196

```

      Phe His Val Leu Val Thr Glu Leu Val Phe Thr Asp Leu Leu Gly Thr
      1          5          10          15
25     Cys Leu Ile Ser Pro Val Val Leu Ala Ser Tyr Ala Arg Asn Gln Thr
      20          25          30
      Leu Val Ala Leu Ala Pro Glu Ser Arg Ala Cys Thr Tyr Phe Ala
      35          40          45

```

30 <210> 197

<211> 47

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> PGF GPCR TM2

40 <400> 197

```

      Phe Leu Leu Leu Ala Ser Gly Leu Val Ile Thr Asp Phe Phe Gly His
      1          5          10          15
45     Leu Ile Asn Gly Ala Ile Ala Val Phe Val Tyr Ala Ser Asp Lys Glu
      20          25          30
      Trp Ile Arg Phe Asp Gln Ser Asn Val Leu Cys Ser Ile Phe Gly
      35          40          45

```

50 <210> 198

<211> 48

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> PGI GPCR TM2

60 <400> 198

```

      Phe Ala Val Leu Val Thr Gly Leu Ala Ala Thr Asp Leu Leu Gly Thr
      1          5          10          15
65     Ser Phe Leu Ser Pro Ala Val Phe Val Ala Tyr Ala Arg Asn Ser Ser
      20          25          30
      Leu Leu Gly Leu Ala Arg Gly Gly Pro Ala Leu Cys Asp Ala Phe Ala
      35          40          45

```

ES 2 299 242 T3

<210> 199

<211> 47

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> TXA2 GPCR TM2

10 <400> 199

	Phe	Leu	Thr	Phe	Leu	Cys	Gly	Leu	Val	Leu	Thr	Asp	Phe	Leu	Gly	Leu
	1				5					10					15	
15	Leu	Val	Thr	Gly	Thr	Ile	Val	Val	Ser	Gln	His	Ala	Ala	Leu	Phe	Glu
				20					25					30		
	Trp	His	Ala	Val	Asp	Pro	Gly	Cys	Arg	Leu	Cys	Arg	Phe	Met	Gly	
			35					40					45			

20 <210> 200

<211> 41

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> PAF GPCR TM2

30 <400> 200

	Ile	Phe	Met	Val	Asn	Leu	Thr	Met	Ala	Asp	Met	Leu	Phe	Leu	Ile	Thr
	1				5					10					15	
	Leu	Pro	Leu	Trp	Ile	Val	Tyr	Tyr	Gln	Asn	Gln	Gly	Asn	Trp	Ile	Leu
35				20					25					30		
	Pro	Lys	Phe	Leu	Cys	Asn	Val	Ala	Gly							
			35					40								

40 <210> 201

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> M2 GPCR TM2

<400> 201

	Asn	Asn	Tyr	Phe	Leu	Phe	Ser	Leu	Ala	Cys	Ala	Asp	Leu	Ile	Ile	Gly
	1				5					10					15	
	Val	Phe	Ser	Met	Asn	Leu	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Thr	Val	Ile	Gly	Tyr	Trp
55				20					25					30		
	Pro	Leu	Gly	Pro	Val	Val	Cys	Asp	Leu	Trp	Leu					
			35					40								

60 <210> 202

<211> 43

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> M4 GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 202

```

5      Asn Asn Tyr Phe Leu Phe Ser Leu Ala Cys Ala Asp Leu Ile Ile Gly
      1      5      10      15
      Ala Phe Ser Met Asn Leu Tyr Thr Val Tyr Ile Ile Lys Gly Tyr Trp
      20      25      30
      Pro Leu Gly Ala Val Val Cys Asp Leu Trp Leu
      35      40

```

10

<210> 203

<211> 43

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M1 GPCR TM2

20

<400> 203

```

25      Asn Asn Tyr Phe Leu Leu Ser Leu Ala Cys Ala Asp Leu Ile Ile Gly
      1      5      10      15
      Thr Phe Ser Met Asn Leu Tyr Thr Thr Tyr Leu Leu Met Gly His Trp
      20      25      30

```

30

```

      Ala Leu Gly Thr Leu Ala Cys Asp Leu Trp Leu
      35      40

```

35

<210> 204

<211> 43

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M3 GPCR TM2

45

<400> 204

```

50      Asn Asn Tyr Phe Leu Leu Ser Leu Ala Cys Ala Asp Leu Ile Ile Gly
      1      5      10      15
      Val Ile Ser Met Asn Leu Phe Thr Thr Tyr Ile Ile Met Asn Arg Trp
      20      25      30
      Ala Leu Gly Asn Leu Ala Cys Asp Leu Trp Leu
      35      40

```

55

<210> 205

<211> 43

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> M5 GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 205

```

      Asn Asn Tyr Tyr Leu Leu Ser Leu Ala Cys Ala Asp Leu Ile Ile Gly
      1           5           10           15
5      Ile Phe Ser Met Asn Leu Tyr Thr Thr Tyr Ile Leu Met Gly Arg Trp
      20           25           30
      Ala Leu Gly Ser Leu Ala Cys Asp Leu Trp Leu
      35           40

```

<210> 206

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> H1 GPCR TM2

<400> 206

```

      Gly Asn Leu Tyr Ile Val Ser Leu Ser Val Ala Asp Leu Ile Val Gly
      1           5           10           15
25     Ala Val Val Met Pro Met Asn Ile Leu Tyr Leu Leu Met Ser Lys Trp
      20           25           30
      Ser Leu Gly Arg Pro Leu Cys Leu Phe Trp Leu
      35           40

```

<210> 207

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> H2 GPCR TM2

<400> 207

```

      Thr Asn Cys Phe Ile Val Ser Leu Ala Ile Thr Asp Leu Leu Leu Gly
      1           5           10           15
      Leu Leu Val Leu Pro Phe Ser Ala Ile Tyr Gln Leu Ser Cys Lys Trp
      20           25           30
45     Ser Phe Gly Lys Val Phe Cys Asn Ile Tyr Thr
      35           40

```

<210> 208

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 5HT1A GPCR TM2

<400> 208

```

      Ala Asn Tyr Leu Ile Gly Ser Leu Ala Val Thr Asp Leu Met Val Ser
      1           5           10           15
60     Val Leu Val Leu Pro Met Ala Ala Leu Tyr Gln Val Leu Asn Lys Trp
      20           25           30
      Thr Leu Gly Gln Val Thr Cys Asp Leu Phe Ile
      35           40

```

<210> 209

<211> 43

ES 2 299 242 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> 5HT1B GPCR TM2
 <400> 209
 10 Ala Asn Tyr Leu Ile Ala Ser Leu Ala Val Thr Asp Leu Leu Val Ser
 1 5 10 15
 Ile Leu Val Met Pro Ile Ser Thr Met Tyr Thr Val Thr Gly Arg Trp
 20 25 30
 15 Thr Leu Gly Gln Val Val Cys Asp Phe Trp Leu
 35 40
 <210> 210
 20 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> 5HT1D GPCR TM2
 <400> 210
 30 Ala Asn Tyr Leu Ile Gly Ser Leu Ala Thr Thr Asp Leu Leu Val Ser
 1 5 10 15
 Ile Leu Val Met Pro Ile Ser Ile Ala Tyr Thr Ile Thr His Thr Trp
 20 25 30
 35 Asn Phe Gly Gln Ile Leu Cys Asp Ile Trp Leu
 35 40
 <210> 211
 40 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> 5HT1E GPCR TM2
 <400> 211
 50 Ala Asn Tyr Leu Ile Cys Ser Leu Ala Val Thr Asp Leu Leu Val Ala
 1 5 10 15
 Val Leu Val Met Pro Leu Ser Ile Ile Tyr Ile Val Met Asp Arg Trp
 20 25 30
 55 Lys Leu Gly Tyr Phe Leu Cys Glu Val Trp Leu
 35 40
 60 <210> 212
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> 5HT1F GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 212

```

      Ala Asn Tyr Leu Ile Cys Ser Leu Ala Val Thr Asp Phe Leu Val Ala
      1      5      10      15
5     Val Leu Val Met Pro Phe Ser Ile Val Tyr Ile Val Arg Glu Ser Trp
      20      25      30
      Ile Met Gly Gln Val Val Cys Asp Ile Trp Leu
      35      40

```

10 <210> 213

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> 5HT2A GPCR TM2

<400> 213

```

20     Thr Asn Tyr Phe Leu Met Ser Leu Ala Ile Ala Asp Met Leu Leu Gly
      1      5      10      15
      Phe Leu Val Met Pro Val Ser Met Leu Thr Ile Leu Tyr Gly Tyr Arg
      20      25      30
25     Trp Pro Leu Pro Ser Lys Leu Cys Ala Val Trp Ile
      35      40

```

<210> 214

30 <211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> 5HT2B GPCR TM2

<400> 214

```

40     Thr Asn Tyr Phe Leu Met Ser Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Val Gly
      1      5      10      15
      Leu Phe Val Met Pro Ile Ala Leu Leu Thr Ile Met Phe Glu Ala Met
      20      25      30
45     Trp Pro Leu Pro Leu Val Leu Cys Pro Ala Trp Leu
      35      40

```

<210> 215

<211> 44

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 5HT2C GPCR TM2

55

<400> 215

```

60     Thr Asn Tyr Phe Leu Met Ser Leu Ala Ile Ala Asp Met Leu Val Gly
      1      5      10      15
      Leu Leu Val Met Pro Leu Ser Leu Leu Ala Ile Leu Tyr Asp Tyr Val
      20      25      30
      Trp Pro Leu Pro Arg Tyr Leu Cys Pro Val Trp Ile
      35      40
65

```

<210> 216

<211> 44

ES 2 299 242 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> 5HT5A GPCR TM2

<400> 216

```

10      Pro His Asn Leu Val Ala Ser Met Ala Val Ser Asp Val Leu Val Ala
        1          5          10          15
        Ala Leu Val Met Pro Leu Ser Leu Val His Glu Leu Ser Gly Arg Arg
                20          25          30
15      Trp Gln Leu Gly Arg Arg Leu Cys Gln Leu Trp Ile
                35          40

```

<210> 217

<211> 45

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> 5HT5Brat GPCR TM2

<400> 217

```

30      Pro His Asn Leu Val Ala Ser Thr Ala Val Ser Asp Val Leu Val Ala
        1          5          10          15
        Ala Leu Val Met Pro Leu Ser Leu Val Ser Glu Leu Ser Ala Gly Arg
                20          25          30
35      Arg Trp Gln Leu Gly Arg Ser Leu Cys His Val Trp Ile
                35          40          45

```

<210> 218

<211> 43

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> 5HT6rat GPCR TM2

<400> 218

```

50      Ser Asn Phe Phe Leu Val Ser Leu Phe Thr Ser Asp Leu Met Val Gly
        1          5          10          15
        Leu Val Val Met Pro Pro Ala Met Leu Asn Ala Leu Tyr Gly Arg Trp
                20          25          30

```

55

```

      Val Leu Ala Arg Gly Leu Cys Leu Leu Trp Thr
        35          40

```

60 <210> 219

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> 5HT7 GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 219

```

        Ser Asn Tyr Leu Ile Val Ser Leu Ala Leu Ala Asp Leu Ser Val Ala
        1           5           10           15
5      Val Ala Val Met Pro Phe Val Ser Val Thr Asp Leu Ile Gly Gly Lys
        20           25           30
        Trp Ile Phe Gly His Phe Phe Cys Asn Val Phe Ile
        35           40

```

10 <210> 220

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> alpha1A GPCR TM2

20 <400> 220

```

        Thr Asn Tyr Phe Ile Val Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Leu Ser
        1           5           10           15
25     Ala Thr Val Leu Pro Phe Ser Ala Thr Met Glu Val Leu Gly Phe Trp
        20           25           30
        Ala Phe Gly Arg Ala Phe Cys Asp Val Trp Ala
        35           40

```

<210> 221

30 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> alpha1B GPCR TM2

<400> 221

```

        Thr Asn Tyr Phe Ile Val Asn Leu Ala Met Ala Asp Leu Leu Leu Ser
        1           5           10           15
45     Phe Thr Val Leu Pro Phe Ser Ala Ala Leu Glu Val Leu Gly Tyr Trp
        20           25           30
        Val Leu Gly Arg Ile Phe Cys Asp Ile Trp Ala
        35           40

```

<210> 222

<211> 43

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> alpha1C GPCR TM2

<400> 222

```

        Thr His Tyr Tyr Ile Val Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Leu Thr
        1           5           10           15
60     Ser Thr Val Leu Pro Phe Ser Ala Ile Phe Glu Val Leu Gly Tyr Trp
        20           25           30
        Ala Phe Gly Arg Val Phe Cys Asn Ile Trp Ala
        35           40

```

65 <210> 223

<211> 43

ES 2 299 242 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> alpha2A GPCR TM2

<400> 223

```

10      Gln Asn Leu Phe Leu Val Ser Leu Ala Ser Ala Asp Ile Leu Val Ala
        1          5          10          15
        Thr Leu Val Ile Pro Phe Ser Leu Ala Asn Glu Val Met Gly Tyr Trp
                20          25          30
15      Tyr Phe Gly Lys Ala Trp Cys Glu Ile Tyr Leu
        35          40

```

<210> 224

20 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> alpha2B GPCR TM2

<400> 224

```

30      Gln Asn Leu Phe Leu Val Ser Leu Ala Ala Ala Asp Ile Leu Val Ala
        1          5          10          15
        Thr Leu Ile Ile Pro Phe Ser Leu Ala Asn Glu Leu Leu Gly Tyr Trp
                20          25          30
35      Tyr Phe Arg Arg Thr Trp Cys Glu Val Tyr Leu
        35          40

```

<210> 225

40 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> alpha2C1 Y alpha2C2 GPCR TM2

<400> 225

```

50      Gln Asn Leu Phe Leu Val Ser Leu Ala Ser Ala Asp Ile Leu Val Ala
        1          5          10          15
        Thr Leu Val Met Pro Phe Ser Leu Ala Asn Glu Leu Met Ala Tyr Trp
                20          25          30
55      Tyr Phe Gly Gln Val Trp Cys Gly Val Tyr Leu
        35          40

```

<210> 226

60 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> beta1 GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 226

```

      Thr Asn Leu Phe Ile Met Ser Leu Ala Ser Ala Asp Leu Val Met Gly
      1      5      10      15
5      Leu Leu Val Val Pro Phe Gly Ala Thr Ile Val Val Trp Gly Arg Trp
      20      25      30
      Glu Tyr Gly Ser Phe Phe Cys Glu Leu Trp Thr
      35      40

```

<210> 227

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> beta2 GPCR TM2

<400> 227

```

      Thr Asn Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ala Cys Ala Asp Leu Val Met Gly
      1      5      10      15
25      Leu Ala Val Val Pro Phe Gly Ala Ala His Ile Leu Met Lys Met Trp
      20      25      30
      Thr Phe Gly Asn Phe Trp Cys Glu Phe Trp Thr
      35      40

```

<210> 228

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> beta3 GPCR TM2

<400> 228

```

      Thr Asn Val Phe Val Thr Ser Leu Ala Ala Ala Asp Leu Val Met Gly
      1      5      10      15
45      Leu Leu Val Val Pro Pro Ala Ala Thr Leu Ala Leu Thr Gly His Trp
      20      25      30
      Pro Leu Gly Ala Thr Gly Cys Glu Leu Trp Thr
      35      40

```

<210> 229

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> beta4turkey GPCR TM2

<400> 229

```

      Thr Asn Val Phe Val Thr Ser Leu Ala Cys Ala Asp Leu Val Met Gly
      1      5      10      15
65      Leu Leu Val Val Pro Pro Gly Ala Thr Ile Leu Leu Ser Gly His Trp
      20      25      30
      Pro Tyr Gly Thr Val Val Cys Glu Leu Trp Thr
      35      40

```

ES 2 299 242 T3

<210> 230
 <211> 42
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> D1A GPCR TM2

10 <400> 230

	Thr	Asn	Phe	Phe	Val	Ile	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Asp	Leu	Leu	Val	Ala
	1				5					10					15	
15	Val	Leu	Val	Met	Pro	Trp	Lys	Ala	Val	Ala	Glu	Ile	Ala	Gly	Phe	Trp
				20					25					30		
	Pro	Phe	Gly	Ser	Phe	Cys	Asn	Ile	Trp	Val						
			35					40								

20 <210> 231
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> D2 GPCR TM2

30 <400> 231

	Thr	Asn	Tyr	Leu	Ile	Val	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Leu	Leu	Val	Ala
	1				5					10					15	
35	Thr	Leu	Val	Met	Pro	Trp	Val	Val	Tyr	Leu	Glu	Val	Val	Gly	Glu	Trp
				20					25					30		
	Lys	Phe	Ser	Arg	Ile	His	Cys	Asp	Ile	Phe	Val					
			35					40								

40 <210> 232
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> D3 GPCR TM2

50 <400> 232

	Thr	Asn	Tyr	Leu	Val	Val	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Leu	Leu	Val	Ala
	1				5					10					15	
55	Thr	Leu	Val	Met	Pro	Trp	Val	Val	Tyr	Leu	Glu	Val	Thr	Gly	Gly	Val
				20					25					30		
	Trp	Asn	Phe	Ser	Arg	Ile	Cys	Cys	Asp	Val	Phe	Val				
			35					40								

60 <210> 233
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> D4 GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 233

```

5      Thr Asn Ser Phe Ile Val Ser Leu Ala Ala Ala Asp Leu Leu Leu Ala
      1      5      10      15
      Leu Leu Val Leu Pro Leu Phe Val Tyr Ser Glu Val Gln Gly Gly Ala
      20      25      30

```

10

```

      Trp Leu Leu Ser Pro Arg Leu Cys Asp Ala Leu Met
      35      40

```

15

<210> 234

<211> 42

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> D5 GPCR TM2

25

<400> 234

```

30      Thr Asn Val Phe Ile Val Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Phe Val Ala
      1      5      10      15
      Leu Leu Val Met Pro Trp Lys Ala Val Ala Glu Val Ala Gly Tyr Trp
      20      25      30
      Pro Phe Gly Ala Phe Cys Asp Val Trp Val
      35      40

```

35

<210> 235

<211> 41

<212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> A1 GPCR TM2

45

<400> 235

```

50      Thr Phe Cys Phe Ile Val Ser Leu Ala Val Ala Asp Val Ala Val Gly
      1      5      10      15
      Ala Leu Val Ile Pro Leu Ala Ile Leu Ile Asn Ile Gly Pro Gln Thr
      20      25      30
      Tyr Phe His Thr Cys Leu Met Val Ala
      35      40

```

55

<210> 236

<211> 41

60

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65

<223> A2a GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 236

```

      Thr Asn Tyr Phe Val Val Ser Leu Ala Ala Ala Asp Ile Ala Val Gly
      1          5          10          15
5      Val Leu Ala Ile Pro Phe Ala Ile Thr Ile Ser Thr Gly Phe Cys Ala
      20          25          30
      Ala Cys His Gly Cys Leu Phe Ile Ala
      35          40

```

<210> 237

<211> 41

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> A2b GPCR TM2

20 <400> 237

```

      Thr Asn Tyr Phe Leu Val Ser Leu Ala Ala Ala Asp Val Ala Val Gly
      1          5          10          15
25     Leu Phe Ala Ile Pro Phe Ala Ile Thr Ile Ser Leu Gly Phe Cys Thr
      20          25          30
      Asp Phe Tyr Gly Cys Leu Phe Leu Ala
      35          40

```

<210> 238

<211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> A3 GPCR TM2

<400> 238

```

40      Thr Phe Tyr Phe Ile Val Ser Leu Ala Leu Ala Asp Ile Ala Val Gly
      1          5          10          15
      Val Leu Val Met Pro Leu Ala Ile Val Val Ser Leu Gly Ile Thr Ile
      20          25          30
45     His Phe Tyr Ser Cys Leu Phe Met Thr
      35          40

```

<210> 239

<211> 43

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> OCdrome GPCR TM2

<400> 239

```

60      Gln Asn Phe Phe Ile Val Ser Leu Ala Val Ala Asp Leu Thr Val Ala
      1          5          10          15
      Leu Leu Val Leu Pro Phe Asn Val Ala Tyr Ser Ile Leu Gly Arg Trp
      20          25          30
      Glu Phe Gly Ile His Leu Cys Lys Leu Trp Leu
      35          40

```

<210> 240

<211> 49

ES 2 299 242 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> ACTH GPCR TM2

<400> 240

```

10      Met Tyr Phe Phe Ile Cys Ser Leu Ala Ile Ser Asp Met Leu Gly Ser
        1      5      10      15
      Leu Tyr Lys Ile Leu Glu Asn Ile Leu Ile Ile Leu Arg Asn Met Gly
        20      25      30
      Tyr Leu Lys Pro Arg Gly Ser Phe Glu Thr Thr Ala Asp Asp Ile Ile
15      35      40      45
      Asp

```

<210> 241

20 <211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> MSH GPCR TM2

<400> 241

```

30      Met Tyr Cys Phe Ile Cys Cys Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Val Ser
        1      5      10      15
      Gly Thr Asn Val Leu Glu Thr Ala Val Ile Leu Leu Leu Glu Ala Gly
        20      25      30
35      Ala Leu Val Ala Arg Ala Ala Val Leu Gln Gln Leu Asp Asn Val Ile
        35      40      45
      Asp

```

<210> 242

40 <211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> MC3 GPCR TM2

<400> 242

```

50      Met Tyr Phe Phe Leu Cys Ser Leu Ala Val Ala Asp Met Leu Val Ser
        1      5      10      15
      Val Ser Asn Ala Leu Glu Thr Ile Met Ile Ala Ile Val His Ser Asp
        20      25      30
55      Asp Tyr Thr Phe Glu Asp Gln Phe Ile Gln His Met Asp Asn Ile Phe
        35      40      45
      Asp

```

60 <210> 243

<211> 48

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> MC4 GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 243

	Met	Tyr	Phe	Phe	Ile	Cys	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Met	Leu	Val	Ser
	1				5					10					15	
5	Val	Ser	Asn	Gly	Ser	Glu	Thr	Ile	Ile	Ile	Thr	Leu	Leu	Asn	Ser	Thr
				20					25					30		
	Asp	Thr	Asp	Ala	Gln	Ser	Phe	Thr	Val	Asn	Ile	Asp	Asn	Val	Ile	Asp
			35					40					45			

10
<210> 244
<211> 49
<212> PRT

15
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> MC5 GPCR TM2

20
<400> 244

	Met	Tyr	Phe	Phe	Val	Cys	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Met	Leu	Val	Ser
	1				5					10					15	
25	Met	Ser	Ser	Ala	Trp	Glu	Thr	Ile	Thr	Ile	Tyr	Leu	Leu	Asn	Asn	Lys
				20					25					30		
	His	Leu	Val	Ile	Ala	Asp	Ala	Phe	Val	Arg	His	Ile	Asp	Asn	Val	Phe
			35					40					45			
	Asp															

30
<210> 245
<211> 43
<212> PRT

35
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> melatonina GPCR TM2

40
<400> 245

	Gly	Asn	Ile	Phe	Val	Val	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Leu	Val	Val	Ala
	1				5					10					15	
45	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Pro	Leu	Val	Leu	Met	Ser	Ile	Phe	Asn	Asn	Gly	Trp
				20					25					30		
	Asn	Leu	Gly	Tyr	Leu	His	Cys	Gln	Val	Ser	Gly					
			35					40								

50
<210> 246
<211> 43
<212> PRT

55
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> oxitocina GPCR TM2

<400> 246

60	Leu	Phe	Phe	Phe	Met	Lys	His	Leu	Ser	Ile	Ala	Asp	Leu	Val	Val	Ala
	1				5					10					15	
	Val	Phe	Gln	Val	Leu	Pro	Gln	Leu	Leu	Trp	Asp	Ile	Thr	Phe	Arg	Phe
				20					25					30		
65	Tyr	Gly	Pro	Asp	Leu	Leu	Cys	Arg	Leu	Val	Lys					
			35					40								

ES 2 299 242 T3

<210> 247

<211> 43

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> conopressinLs GPCR TM2

10 <400> 247

```

      Met Gln Trp Phe Ile Ala His Leu Ala Phe Ala Asp Ile Phe Val Gly
      1      5      10      15
15    Phe Phe Asn Ile Leu Pro Gln Leu Ile Ser Asp Val Thr Ile Val Phe
      20      25      30
      His Gly Asp Asp Phe Thr Cys Arg Phe Ile Lys
      35      40

```

20 <210> 248

<211> 43

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> V1A GPCR TM2

30 <400> 248

```

      Met His Leu Phe Ile Arg His Leu Ser Leu Ala Asp Leu Ala Val Ala
      1      5      10      15
35    Phe Phe Gln Val Leu Pro Gln Met Cys Trp Asp Ile Thr Tyr Arg Phe
      20      25      30
      Arg Gly Pro Asp Trp Leu Cys Arg Val Val Lys
      35      40

```

40 <210> 249

<211> 43

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> V1B GPCR TM2

50 <400> 249

```

      Met His Leu Phe Val Leu His Leu Ala Leu Thr Asp Leu Ala Val Ala
      1      5      10      15
55    Leu Phe Gln Val Leu Pro Gln Leu Leu Trp Asp Ile Thr Tyr Arg Phe
      20      25      30
      Gln Gly Pro Asp Leu Leu Cys Arg Ala Val Lys
      35      40

```

60 <210> 250

<211> 43

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> V2 GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 250

```

5      Ile His Val Phe Ile Gly His Leu Cys Leu Ala Asp Leu Ala Val Ala
      1      5      10      15
      Leu Phe Gln Val Leu Pro Gln Leu Ala Trp Lys Ala Thr Asp Arg Phe
      20      25      30
      Arg Gly Pro Asp Ala Leu Cys Arg Ala Val Lys
10     35      40

```

<210> 251

<211> 43

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> CCK_A GPCR TM2

<400> 251

```

25     Thr Asn Ile Phe Leu Leu Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Met Leu Cys
      1      5      10      15
      Leu Phe Cys Met Pro Phe Asn Leu Ile Pro Asn Leu Leu Lys Asp Phe
      20      25      30

```

30

```

      Ile Phe Gly Ser Ala Val Cys Lys Thr Thr Thr
      35      40

```

35

<210> 252

<211> 43

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> CCK_B GPCR TM2

<400> 252

```

50     Thr Asn Ala Phe Leu Leu Ser Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Leu Ala
      1      5      10      15
      Val Ala Cys Met Pro Phe Thr Leu Leu Pro Asn Leu Met Gly Thr Phe
      20      25      30

```

55

```

      Ile Phe Gly Thr Val Ile Cys Lys Ala Val Ser
      35      40

```

<210> 253

60 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> NPY1 GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 253

```

      Thr Asn Ile Leu Ile Val Asn Leu Ser Phe Ser Asp Leu Leu Val Ala
      1           5           10           15
5      Ile Met Cys Leu Pro Phe Thr Phe Val Tyr Thr Leu Met Asp His Trp
      20           25           30
      Val Phe Gly Glu Ala Met Cys Lys Leu Asn Pro
      35           40

```

<210> 254

<211> 45

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> NTR GPCR TM2

<400> 254

```

      Val His Tyr His Leu Gly Ser Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Thr Leu
      1           5           10           15
25     Leu Leu Ala Met Pro Val Glu Leu Tyr Asn Phe Ile Trp Val His His
      20           25           30
      Pro Trp Ala Phe Gly Asp Ala Gly Cys Arg Gly Tyr Tyr
      35           40           45

```

<210> 255

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> NK1 GPCR TM2

<400> 255

```

      Thr Asn Tyr Phe Leu Val Asn Leu Ala Phe Ala Glu Ala Ser Met Ala
      1           5           10           15
45     Ala Phe Asn Thr Val Val Asn Phe Thr Tyr Ala Val His Asn Glu Trp
      20           25           30
      Tyr Tyr Gly Leu Phe Tyr Cys Lys Phe His Asn
      35           40

```

<210> 256

<211>43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> NK2 GPCR TM2

<400> 256

```

      Thr Asn Tyr Phe Ile Val Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Cys Met Ala
      1           5           10           15
60     Ala Phe Asn Ala Ala Phe Asn Phe Val Tyr Ala Ser His Asn Ile Trp
      20           25           30
      Tyr Phe Gly Arg Ala Phe Cys Tyr Phe Gln Asn
      35           40

```

<210> 257

<211> 43

ES 2 299 242 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

5 <223> NK3 GPCR TM2

<400> 257

10	Thr	Asn	Tyr	Phe	Leu	Val	Asn	Leu	Ala	Phe	Ser	Asp	Ala	Ser	Met	Ala
	1				5					10					15	
	Ala	Phe	Asn	Thr	Leu	Val	Asn	Phe	Ile	Tyr	Ala	Leu	His	Ser	Glu	Trp
				20					25					30		
15	Tyr	Phe	Gly	Ala	Asn	Tyr	Cys	Arg	Phe	Gln	Asn					
			35					40								

<210> 258

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> blueops GPCR TM2

<400> 258

35

Leu	Asn	Tyr	Ile	Leu	Val	Asn	Val	Ser	Phe	Gly	Gly	Phe	Leu	Leu	Cys
1				5					10					15	
Ile	Phe	Ser	Val	Phe	Pro	Val	Phe	Val	Ala	Ser	Cys	Asn	Gly	Tyr	Phe
			20					25					30		
Val	Phe	Gly	Arg	His	Val	Cys	Ala	Leu	Glu	Gly					
		35					40								

<210> 259

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> greenops GPCR TM2

<400> 259

55

Leu	Asn	Trp	Ile	Leu	Val	Asn	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Leu	Ala	Glu	Thr
1				5					10					15	
Val	Ile	Ala	Ser	Thr	Ile	Ser	Val	Val	Asn	Gln	Val	Tyr	Gly	Tyr	Phe
			20					25					30		
Val	Leu	Gly	His	Pro	Met	Cys	Val	Leu	Glu	Gly					
		35					40								

<210> 260

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> redops GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 260

```

      Leu Asn Trp Ile Leu Val Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu Ala Glu Thr
      1      5      10      15
5      Val Ile Ala Ser Thr Ile Ser Ile Val Asn Gln Val Ser Gly Tyr Phe
      20      25      30
      Val Leu Gly His Pro Met Cys Val Leu Glu Gly
      35      40

```

<210> 261

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> rodopsina GPCR TM2

<400> 261

```

20      Leu Asn Tyr Ile Leu Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu Phe Met Val
      1      5      10      15
      Leu Gly Gly Phe Thr Ser Thr Leu Tyr Thr Ser Leu His Gly Tyr Phe
      20      25      30
25      Val Phe Gly Pro Thr Gly Cys Asn Leu Glu Gly
      35      40

```

<210> 262

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> violetopsGg GPCR TM2

<400> 262

```

40      Leu Asn Tyr Ile Leu Val Asn Ile Ser Ala Ser Gly Phe Val Ser Cys
      1      5      10      15
      Val Leu Ser Val Phe Val Val Phe Val Ala Ser Ala Arg Gly Tyr Phe
      20      25      30
45      Val Phe Gly Lys Arg Val Cys Glu Leu Glu Ala
      35      40

```

<210> 263

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> opsin_crab GPCR TM2

<400> 263

```

60      Thr Asn Leu Leu Val Val Asn Leu Ala Phe Ser Asp Phe Cys Met Met
      1      5      10      15
      Ala Phe Met Met Pro Thr Met Thr Ser Asn Cys Phe Ala Glu Thr Trp
      20      25      30
      Ile Leu Gly Pro Phe Met Cys Glu Val Tyr Gly
      35      40

```

<210> 264

<211> 48

ES 2 299 242 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

5 <223> ET_Aprec GPCR TM2

<400> 264

10	Pro	Asn	Ala	Leu	Ile	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Gly	Asp	Leu	Ile	Tyr	Val
	1				5					10					15	
	Val	Ile	Asp	Leu	Pro	Ile	Asn	Val	Phe	Lys	Leu	Leu	Ala	Gly	Arg	Trp
				20					25					30		
15	Pro	Phe	Asp	His	Asn	Asp	Phe	Gly	Val	Phe	Leu	Cys	Lys	Leu	Phe	Pro
			35					40					45			

<210> 265

<211> 43

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> ET_Bprec GPCR TM2

<400> 265

30

Pro	Asn	Ile	Leu	Ile	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Gly	Asp	Leu	Leu	His	Ile
1				5					10					15	
Val	Ile	Asp	Ile	Pro	Ile	Asn	Val	Tyr	Lys	Leu	Leu	Ala	Glu	Asp	Trp
			20					25					30		
Pro	Phe	Gly	Ala	Glu	Met	Cys	Lys	Leu	Val	Pro					
		35					40								

<210> 266

<211> 39

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> ET_Cfrog GPCR TM2

45 <400> 266

Pro Asn Val Leu Ile Ala Ser Leu Ala Leu Gly Asp Leu Phe Tyr Ile
1 5 10 15
Leu Ile Ala Ile Pro Ile Ile Ser Ile Ser Phe Trp Leu Ser Thr Gly
20 25 30

50

55
His Ser Glu Tyr Ile Tyr Gln
35

60 $\langle 210 \rangle$ 267

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 $\langle 220 \rangle$

<223> galatina GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 267

```

    Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ser Ile Ala Asp Leu Ala Tyr Leu
  1           5           10           15
5    Leu Phe Cys Ile Pro Phe Gln Ala Thr Val Tyr Ala Leu Pro Thr Trp
    20           25           30
    Val Leu Gly Ala Phe Ile Cys Lys Phe Ile His
    35           40

```

<210> 268

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> NMBGPCR TM2

<400> 268

```

    Pro Asn Ile Phe Ile Ser Asn Leu Ala Ala Gly Asp Leu Leu Leu Leu
  1           5           10           15
25   Leu Thr Cys Val Pro Val Asp Ala Ser Arg Tyr Phe Phe Asp Glu Trp
    20           25           30
    Met Phe Gly Lys Val Gly Cys Lys Leu Ile Pro
    35           40

```

<210> 269

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GRP GPCR TM2

<400> 269

```

    Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Leu Ala Leu Gly Asp Leu Leu Leu Leu
  1           5           10           15
45   Ile Thr Cys Ala Pro Val Asp Ala Ser Arg Tyr Leu Ala Asp Arg Trp
    20           25           30
    Leu Phe Gly Arg Ile Gly Cys Lys Leu Ile Pro
    35           40

```

<210> 270

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> BRS3 GPCR TM2

<400> 270

```

    Pro Asn Ile Phe Ile Thr Ser Leu Ala Phe Gly Asp Leu Leu Leu Leu
  1           5           10           15
65   Leu Thr Cys Val Pro Val Asp Ala Thr His Tyr Leu Ala Glu Gly Trp
    20           25           30
    Leu Phe Gly Arg Ile Gly Cys Lys Val Leu Ser
    35           40

```

ES 2 299 242 T3

<210> 271
 <211> 42
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> deltaOP GPCR TM2
 10 <400> 271

	Thr	Asn	Ile	Tyr	Ile	Phe	Asn	Leu	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Ala	Thr
	1				5					10					15	
15	Ser	Thr	Leu	Pro	Phe	Gln	Ser	Ala	Lys	Tyr	Leu	Met	Glu	Thr	Trp	Pro
				20					25					30		
	Phe	Gly	Glu	Leu	Leu	Cys	Lys	Ala	Val	Leu						
			35					40								

 20 <210> 272
 <211> 42
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> kappaOP GPCR TM2
 30 <400> 272

	Thr	Asn	Ile	Tyr	Ile	Phe	Asn	Leu	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Val	Thr
	1				5					10					15	
35	Thr	Thr	Met	Pro	Phe	Gln	Ser	Thr	Val	Tyr	Leu	Met	Asn	Ser	Trp	Pro
				20					25					30		
	Phe	Gly	Asp	Val	Leu	Cys	Lys	Ile	Val	Ile						
			35					40								

 40 <210> 273
 <211> 42
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> muOP GPCR TM2
 50 <400> 273

	Thr	Asn	Ile	Tyr	Ile	Phe	Asn	Leu	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Ala	Thr
	1				5					10					15	
55	Ser	Thr	Leu	Pro	Phe	Gln	Ser	Val	Asn	Tyr	Leu	Met	Gly	Thr	Trp	Pro
				20					25					30		
	Phe	Gly	Thr	Ile	Leu	Cys	Lys	Ile	Val	Ile						
			35					40								

 60 <210> 274
 <211> 42
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> OPRX GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 274

```

    Thr Asn Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Leu Ala Asp Thr Leu Val Leu
    1      5      10      15
5    Leu Thr Leu Pro Phe Gln Gly Thr Asp Ile Leu Leu Gly Phe Trp Pro
    20      25      30
    Phe Gly Asn Ala Leu Cys Lys Thr Val Ile
    35      40

```

<210> 275

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CB1 GPCR TM2

<400> 275

```

    Ser Tyr His Phe Ile Gly Ser Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Gly Ser
    1      5      10      15
20    Val Ile Phe Val Tyr Ser Phe Ile Asp Phe His Val Phe His Arg Lys
    20      25      30
25    Asp Ser Arg Asn Val Phe Leu Phe Lys Leu
    35      40

```

<210> 276

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CB2 GPCR TM2

<400> 276

```

    Ser Tyr Leu Phe Ile Gly Ser Leu Ala Gly Ala Asp Phe Leu Ala Ser
    1      5      10      15
40    Val Val Phe Ala Cys Ser Phe Val Asn Phe His Val Phe His Gly Val
    20      25      30
45    Asp Ser Lys Ala Val Phe Leu Leu Lys Ile
    35      40

```

<210> 277

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SSTR1 GPCR TM2

<400> 277

```

    Thr Asn Ile Tyr Ile Leu Asn Leu Ala Ile Ala Asp Glu Leu Leu Met
    1      5      10      15
60    Leu Ser Val Pro Phe Leu Val Thr Ser Thr Leu Leu Arg His Trp Pro
    20      25      30
    Phe Gly Ala Leu Leu Cys Arg Leu Val Leu
    35      40

```

<210> 278

<211> 42

ES 2 299 242 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> SSTR2 GPCR TM2
 <400> 278
 10 Thr Asn Ile Tyr Ile Leu Asn Leu Ala Ile Ala Asp Glu Leu Phe Met
 1 5 10 15
 Leu Gly Leu Pro Phe Leu Ala Met Gln Val Ala Leu Val His Trp Pro
 20 25 30
 15 Phe Gly Lys Ala Ile Cys Arg Val Val Met
 35 40
 <210> 279
 20 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> SSTR3 GPCR TM2
 <400> 279
 30 Thr Asn Val Tyr Ile Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Glu Leu Phe Met
 1 5 10 15
 Leu Gly Leu Pro Phe Leu Ala Ala Gln Asn Ala Leu Ser Tyr Trp Pro
 20 25 30
 35 Phe Gly Ser Leu Met Cys Arg Leu Val Met
 35 40
 40 <210> 280
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> SSTR4 GPCR TM2
 50 <400> 280
 Thr Asn Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Glu Leu Phe Met
 1 5 10 15
 55 Leu Ser Val Pro Phe Val Ala Ser Ser Ala Ala Leu Arg His Trp Pro
 20 25 30
 Phe Gly Ser Val Leu Cys Arg Ala Val Leu
 35 40
 60 <210> 281
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> SSTR5 GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 281

```

5      Thr Asn Ile Tyr Ile Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Val Leu Tyr Met
      1          5          10          15
      Leu Gly Leu Pro Phe Leu Ala Thr Gln Asn Ala Ala Ser Phe Trp Pro
          20          25          30

10

      Phe Gly Pro Val Leu Cys Arg Leu Val Met
          35          40

```

<210> 282

<211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL8A e IL8B GPCR TM2

<400> 282

```

30      Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Phe Ala
      1          5          10          15
      Leu Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp Ile Phe
          20          25          30
      Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser
          35          40

```

<210> 283

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AT1a GPCR TM2

<400> 283

```

50      Ala Ser Val Phe Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Cys Phe Leu
      1          5          10          15
      Leu Thr Leu Pro Leu Trp Ala Val Tyr Thr Ala Met Glu Tyr Arg Trp
          20          25          30
      Pro Phe Gly Asn Tyr Leu Cys Lys Ile Ala Ser
          35          40

```

<210> 284

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AT1brat GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 284

```

      Ala Ser Val Phe Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Cys Phe Leu
      1           5           10           15
5      Leu Thr Leu Pro Leu Trp Ala Val Tyr Thr Ala Met Glu Tyr Arg Trp
      20           25           30
      Pro Phe Gly Asn His Leu Cys Lys Ile Ala Ser
      35           40

```

10 <210> 285

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> AT2 GPCR TM2

20 <400> 285

```

      Ser Ser Ile Tyr Ile Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Leu Leu
      1           5           10           15
25      Ala Thr Leu Pro Leu Trp Ala Thr Tyr Tyr Ser Tyr Arg Tyr Asp Trp
      20           25           30
      Leu Phe Gly Pro Val Met Cys Lys Val Phe Gly
      35           40

```

<210> 286

30 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> BK1 GPCR TM2

<400> 286

```

40      Ala Glu Ile Tyr Leu Ala Asn Leu Ala Ala Ser Asp Leu Val Phe Val
      1           5           10           15
      Leu Gly Leu Pro Phe Trp Ala Glu Asn Ile Trp Asn Gln Phe Asn Trp
      20           25           30
45      Pro Phe Gly Ala Leu Leu Cys Arg Val Ile Asn
      35           40

```

<210> 287

<211> 43

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> BK2 GPCR TM2

<400> 287

```

60      Ala Glu Ile Tyr Leu Gly Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu Ile Leu Ala
      1           5           10           15
      Cys Gly Leu Pro Phe Trp Ala Ile Thr Ile Ser Asn Asn Phe Asp Trp
      20           25           30
      Leu Phe Gly Glu Thr Leu Cys Arg Val Val Asn
      35           40
65

```

<210> 288

<211> 42

ES 2 299 242 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> P2Y7 GPCR TM2

<400> 288

```

10      Thr Ala Leu Met Val Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Ala Val Leu
        1          5          10          15
      Leu Thr Ala Pro Phe Phe Leu His Phe Leu Ala Gln Gly Thr Trp Ser
                20          25          30
15      Phe Gly Leu Ala Gly Cys Arg Leu Cys His
        35          40

```

<210> 289

20 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> P2Y6 GPCR TM2

<400> 289

```

30      Ser Ala Val Tyr Thr Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Tyr Ala
        1          5          10          15
      Cys Ser Leu Pro Leu Leu Ile Tyr Asn Tyr Ala Arg Gly Asp His Trp
                20          25          30
35      Pro Phe Gly Asp Leu Ala Cys Arg Leu Val Arg
        35          40

```

<210> 290

40 <211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> P2Y5 GPCR TM2

<400> 290

```

50      Thr Thr Thr Tyr Met Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Val
        1          5          10          15
      Phe Thr Leu Pro Phe Arg Ile Tyr Tyr Phe Val Val Arg Asn Trp Pro
                20          25          30
55      Phe Gly Asp Val Leu Cys Lys Ile Ser Val
        35          40

```

60 <210> 291

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> P2Y4 GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 291

	Thr	Ala	Thr	Tyr	Met	Phe	His	Leu	Ala	Leu	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Val
	1				5					10					15	
5	Val	Ser	Leu	Pro	Thr	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Ala	His	Asn	His	Trp
				20					25					30		
	Pro	Phe	Gly	Thr	Glu	Ile	Cys	Lys	Phe	Val	Arg					
			35					40								

10 <210> 292
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> P2Y3chick GPCR TM2

<400> 292

	Thr	Thr	Ile	Tyr	Met	Leu	Asn	Leu	Ala	Met	Ala	Asp	Leu	Leu	Tyr	Val
	1				5					10					15	
	Cys	Ser	Leu	Pro	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Thr	Gln	Lys	Asp	Tyr	Trp
				20					25					30		
25	Pro	Phe	Gly	Asp	Phe	Thr	Cys	Lys	Phe	Val	Arg					
			35					40								

30 <210> 293
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> P2Y2 GPCR TM2

<400> 293

	Ser	Thr	Thr	Tyr	Met	Phe	His	Leu	Ala	Val	Ser	Asp	Ala	Leu	Tyr	Ala
	1				5					10					15	
	Ala	Ser	Leu	Pro	Leu	Leu	Val	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Arg	Gly	Asp	His	Trp
				20					25					30		
	Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Leu	Cys	Lys	Leu	Val	Arg					
45			35					40								

50 <210> 294
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> P2Y1 GPCR TM2
 55 <400> 294

	Ile	Ser	Val	Tyr	Met	Phe	Asn	Leu	Ala	Leu	Ala	Asp	Phe	Leu	Tyr	Val
	1				5					10					15	
60	Leu	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu	Ile	Phe	Tyr	Tyr	Phe	Asn	Lys	Thr	Asp	Trp
				20					25					30		
	Ile	Phe	Gly	Asp	Ala	Met	Cys	Lys	Leu	Gln	Arg					
			35					40								

65 <210> 295
 <211> 43

ES 2 299 242 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> THRprec GPCR TM2

<400> 295

```

10      Ala Val Val Tyr Met Leu His Leu Ala Thr Ala Asp Val Leu Phe Val
      1          5          10          15
      Ser Val Leu Pro Phe Lys Ile Ser Tyr Tyr Phe Ser Gly Ser Asp Trp
      20          25          30
      Gln Phe Gly Ser Glu Leu Cys Arg Phe Val Thr
15      35          40

```

<210> 296

<211> 42

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> C5a GPCR TM2

25

<400> 296

```

30      Asn Ala Ile Trp Phe Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Ser Cys
      1          5          10          15
      Leu Ala Leu Pro Ile Leu Phe Thr Ser Ile Val Gln His His Trp Pro
      20          25          30

```

35

```

      Phe Gly Gly Ala Ala Cys Ser Ile Leu Pro
      35          40

```

40

<210> 297

<211> 39

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> GP01mouse Y R334rat GPCR TM2

50 <400> 297

```

      Met Phe Leu Leu Ile Gly Ser Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu Ala Gly
      1          5          10          15
      Leu Gly Leu Ile Ile Asn Phe Val Phe Ala Tyr Leu Leu Gln Ser Glu
      20          25          30
55      Ala Thr Lys Leu Val Thr Ile
      35

```

<210> 298

60 <211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> GP21mouse GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 298

```

      Met Phe Leu Leu Val Gly Ser Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Ala Gly
      1           5           10           15
5      Leu Gly Leu Val Leu His Phe Ala Ala Asp Phe Cys Ile Gly Ser Pro
      20           25           30
      Glu Met Ser Leu Met Leu Val
      35

```

10 <210> 299

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> GCRCmouse GPCR TM2

20 <400> 299

```

      Thr Ser Leu Phe Ile Val Asn Leu Ala Val Ala Asp Ile Met Ile Thr
      1           5           10           15
25     Leu Leu Asn Thr Pro Phe Thr Leu Val Arg Phe Val Asn Ser Thr Trp
      20           25           30
      Val Phe Gly Lys Gly Met Cys His Val Ser Arg
      35           40

```

30 <210> 300

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> TXKR GPCR TM2

40 <400> 300

```

      Thr Asn Ser Phe Leu Val Asn Leu Ala Phe Ala Asp Ala Ala Met Ala
      1           5           10           15
45     Ala Leu Asn Ala Leu Val Asn Phe Ile Tyr Ala Leu His Gly Glu Trp
      20           25           30
      Tyr Phe Gly Ala Asn Tyr Cys Arg Phe Gln Asn
      35           40

```

50 <210> 301

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> G10Drat GPCR TM2

60 <400> 301

```

      Leu Asn Leu Tyr Ile Leu Asn Met Ala Val Ala Asp Leu Gly Ile Ile
      1           5           10           15
      Leu Ser Leu Pro Val Trp Met Leu Glu Val Met Leu Glu Tyr Thr Trp
      20           25           30
65     Leu Trp Gly Ser Phe Ser Cys Arg Phe Ile His
      35           40

```

ES 2 299 242 T3

<210> 302

<211> 42

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> RDC1 GPCR TM2

10 <400> 302

```

      His Cys Tyr Ile Leu Asn Leu Ala Ile Ala Asp Leu Trp Val Val Leu
      1      5      10      15
15    Thr Ile Pro Val Trp Val Val Ser Leu Val Gln His Asn Gln Trp Pro
      20      25      30
      Met Gly Glu Leu Thr Cys Lys Val Thr His
      35      40

```

20 <210> 303

<211> 39

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> BLR1 GPCR TM2

30 <400> 303

```

      Thr Phe Leu Phe His Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Leu Val Phe Ile
      1      5      10      15
35    Leu Pro Phe Ala Val Ala Glu Gly Ser Val Gly Trp Val Leu Gly Thr
      20      25      30
      Phe Leu Cys Lys Thr Val Ile
      35

```

40 <210> 304

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> CL5 y LCR1GPCR TM2

<400> 304

50

```

      Leu His Leu Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe
      1      5      10      15
55    Trp Ala Val Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu Cys
      20      25      30
      Lys Ala Val His
      35

```

60 <210> 305

<211> 37

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> EBI1 GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 305

```

      Leu Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Ile Leu Phe Leu Leu Thr Leu Pro
      1           5           10           15
5     Phe Trp Ala Tyr Ser Ala Ala Lys Ser Trp Val Phe Gly Val His Phe
      20           25           30
      Cys Lys Leu Ile Phe
      35

```

10 <210> 306

<211> 37

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> RBS1rat GPCR TM2

20 <400> 306

```

      Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Phe Val Ala Thr Leu Pro
      1           5           10           15
      Phe Trp Thr His Tyr Leu Ile Ser His Glu Gly Leu His Asn Ala Met
      20           25           30
25     Cys Lys Leu Thr Thr
      35

```

<210> 307

30 <211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> EBI2 GPCR TM2

<400> 307

```

      Ser Thr Asn Leu Val Ile Ser Asp Ile Leu Phe Thr Thr Ala Leu Pro
      1           5           10           15
      Thr Arg Ile Ala Tyr Tyr Ala Met Gly Phe Asp Trp Arg Ile Gly Asp
      20           25           30
45     Ala Leu Cys Arg Ile Thr Ala
      35

```

<210> 308

<211> 38

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GCRTchick GPCR TM2

55 <400> 308

```

      Met Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Val Phe Thr Leu Pro
      1           5           10           15
60     Phe Arg Ile Tyr Tyr Phe Val Val Arg Asn Trp Pro Phe Gly Asp Val
      20           25           30
      Leu Cys Lys Ile Ser Val
      35

```

65 <210> 309

<211> 41

<212> PRT

ES 2 299 242 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> APJ GPCR TM2

5

<400> 309

10	Ile	Phe	Ile	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Leu	Thr	Phe	Val	Val	Thr
	1				5				10					15		
	Leu	Pro	Leu	Trp	Ala	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Asp	Trp	Pro	Phe
				20					25					30		
	Gly	Thr	Phe	Phe	Cys	Lys	Leu	Ser	Ser							
			35					40								

15

<210> 310

<211> 43

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> RTArat GPCR TM2

25

<400> 310

30	Phe	Ser	Ile	Tyr	Phe	Leu	His	Leu	Ala	Ser	Ala	Asp	Gly	Ile	Tyr	Leu
	1				5				10					15		
	Phe	Ser	Lys	Ala	Val	Ile	Ala	Leu	Leu	Asn	Met	Gly	Thr	Phe	Leu	Gly
			20					25						30		
	Ser	Phe	Pro	Asp	Tyr	Val	Arg	Arg	Val	Ser	Arg					
			35					40								

35

<210> 311

<211> 44

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> UHRrat GPCR TM2

45

<400> 311

50	Thr	Asn	Phe	Leu	Ile	Gly	Asn	Leu	Ala	Leu	Ser	Asp	Val	Leu	Met	Cys
	1				5				10					15		
	Ala	Ala	Cys	Val	Pro	Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr	Ala	Phe	Glu	Pro	Arg	Gly
			20					25					30			

55

	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Leu	Cys	His	Leu	Val	Phe
		35					40					

60

<210> 312

<211> 43

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> FMRL1 GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 312

```

5      Asn Thr Ile Cys Tyr Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Phe Ser Phe Ser
      1      5      10      15
      Ala Ile Leu Pro Phe Arg Met Val Ser Val Ala Met Arg Glu Lys Trp
      20      25      30
      Pro Phe Ala Ser Phe Leu Cys Lys Leu Val His
      35      40

```

<210> 313

<211> 43

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> FMRL2 GPCR TM2

20 <400> 313

```

25      Thr Thr Ile Cys Tyr Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Phe Ser Phe Thr
      1      5      10      15
      Ala Thr Leu Pro Phe Leu Ile Val Ser Met Ala Met Gly Glu Lys Trp
      20      25      30
      Pro Phe Gly Trp Phe Leu Cys Lys Leu Ile His
      35      40

```

<210> 314

<211> 43

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> fMLP GPCR TM2

40 <400> 314

```

45      Thr Thr Ile Ser Tyr Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Cys Phe Thr
      1      5      10      15
      Ser Thr Leu Pro Phe Phe Met Val Arg Lys Ala Met Gly Gly His Trp
      20      25      30
      Pro Phe Gly Trp Phe Leu Cys Lys Phe Leu Phe
      35      40

```

<210> 315

<211> 43

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLF1catfish GPCR TM2

60 <400> 315

```

65      Lys Tyr Ile Thr Val Phe Asn Leu Ala Leu Ser Asp Leu Gly Gly Ser
      1      5      10      15
      Ser Ala Leu Ile Pro Lys Leu Ile Asp Thr Phe Leu Phe Glu Asn Gln
      20      25      30
      Val Ile Ser Tyr Glu Ala Cys Leu Ala Asn Met
      35      40

```

ES 2 299 242 T3

<210> 316

<211> 43

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLF3catfish GPCR TM2

10 <400> 316

	Lys	Tyr	Ile	Ala	Val	Phe	Asn	Leu	Ala	Leu	Ser	Asp	Leu	Cys	Gly	Ser
	1				5					10					15	
15	Ser	Ala	Leu	Ile	Pro	Lys	Leu	Leu	Asp	Met	Leu	Leu	Phe	Glu	Asn	Gln
			20					25						30		
	Ser	Ile	Ser	Tyr	Glu	Ala	Cys	Leu	Ser	Asn	Met					
			35					40								

20

<210> 317

<211> 43

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLF8catfish GPCR TM2

30

<400> 317

	Met	Cys	Ile	Leu	Ile	Gly	Leu	Met	Ala	Val	Val	Asp	Leu	Ser	Met	Pro
	1				5					10					15	
35	Ile	Phe	Cys	Val	Pro	Asn	Met	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu	Phe	Asn	Trp	Lys
			20					25						30		
	Gly	Ile	Ser	Leu	Val	Gly	Cys	Leu	Val	Gln	Met					
			35					40								

40

<210> 318

<211> 43

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLF32Acatfish GPCR TM2

50 <400> 318

	Lys	Tyr	Met	Gly	Ile	Phe	Asn	Leu	Ala	Leu	Ser	Asp	Phe	Gly	Glu	Thr
	1				5					10					15	
55	Asn	Val	Leu	Ile	Pro	Ser	Leu	Val	Lys	Thr	Leu	Phe	Phe	Asp	Ser	Gln
			20					25						30		
	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Asp	Ala	Cys	Leu	Ala	Asn	Met					
			35					40								

60 <210> 319

<211> 43

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLF32Bcatfish y OLF32Dcatfish GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 319

	Lys	Tyr	Met	Gly	Ile	Phe	Asn	Leu	Ala	Leu	Ser	Asp	Phe	Gly	Glu	Thr
	1				5					10					15	
5	Asn	Ala	Leu	Ile	Pro	Ser	Leu	Val	Lys	Thr	Leu	Phe	Phe	Asp	Ser	Gln
				20					25					30		
	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Asp	Ala	Cys	Leu	Ala	Asn	Met					
			35					40								

10 <210> 320
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> OLF32Ccatfish GPCR TM2

20 <400> 320

	Lys	Tyr	Met	Gly	Ile	Phe	Asn	Leu	Ala	Leu	Ser	Asp	Ile	Gly	Glu	Thr
	1				5					10					15	
25	Asn	Ala	Leu	Ile	Pro	Ser	Leu	Val	Lys	Thr	Leu	Phe	Phe	Asp	Ser	Gln
				20					25					30		
	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Asp	Ala	Cys	Leu	Thr	Asn	Met					
			35					40								

30 <210> 321
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> OLF47catfish GPCR TM2

<400> 321

40	Lys	Phe	Leu	Ala	Val	Phe	Asn	Leu	Ala	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Ile	Asn
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Ile	Ile	Pro	Gln	Met	Val	Pro	Val	Phe	Val	Phe	Asn	Leu	Asn
				20				25						30		
45	His	Ile	Ser	Phe	Glu	Ser	Cys	Phe	Ser	Gln	Met					
			35					40								

<210> 322
 <211> 43
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> OLF202catfish GPCR TM2

<400> 322

60	Met	Tyr	Tyr	Ile	Met	Leu	Asn	Leu	Ala	Ala	Ser	Asp	Val	Leu	Phe	Ser
	1				5					10					15	
	Thr	Thr	Thr	Leu	Pro	Lys	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Trp	Phe	Gly	Asp	Gly
				20				25						30		
	Ser	Ile	Ser	Phe	Val	Gly	Cys	Phe	Ile	Gln	Met					
			35					40								

65 <210> 323
 <211> 43

ES 2 299 242 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> OLFCOR1chicken, OLFCOR3chicken Y OLFCOR4chicken GPCR TM2

<400> 323

```

10      Met Tyr Ile Phe Leu Gln Asn Leu Ser Phe Thr Asp Ala Ala Tyr Ser
        1          5          10          15
        Thr Val Ile Thr Pro Lys Met Leu Ala Thr Phe Leu Glu Glu Arg Lys
                20          25          30
15      Thr Ile Ser Tyr Val Gly Cys Ile Leu Gln Tyr
        35          40

```

<210> 324

20 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> OLFCOR2chicken y OLFCOR5chicken GPCR TM2

<400> 324

```

30      Met Tyr Ile Phe Leu Gln Asn Leu Ser Phe Thr Asp Ala Ala Tyr Ser
        1          5          10          15
        Thr Val Ile Thr Pro Lys Met Leu Ala Thr Phe Leu Glu Glu Arg Arg
                20          25          30
35      Thr Ile Ser Tyr Val Gly Cys Ile Leu Gln Tyr
        35          40

```

<210> 325

40 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> OLFCOR6chicken GPCR TM2

<400> 325

```

50      Met Tyr Ile Phe Leu Gln Asn Leu Ser Phe Thr Asp Ala Val Tyr Ser
        1          5          10          15
        Thr Val Ile Thr Pro Lys Met Leu Ala Thr Phe Leu Glu Glu Thr Lys
                20          25          30
55      Thr Ile Ser Tyr Val Gly Cys Ile Leu Gln Tyr
        35          40

```

<210> 326

60 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> OLFdog GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 326

	Met	Tyr	Leu	Phe	Leu	Ser	Asn	Leu	Ser	Phe	Ser	Asp	Leu	Cys	Phe	Ser
	1				5					10					15	

5

	Ser	Val	Thr	Met	Pro	Lys	Leu	Leu	Gln	Asn	Met	Gln	Ser	Gln	Val	Pro
				20					25					30		

	Ser	Ile	Pro	Tyr	Ala	Gly	Cys	Leu	Thr	Gln	Met
			35					40			

10

<210> 327

<211> 43

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLF07E GPCR TM2

20

<400> 327

	Val	Tyr	Phe	Phe	Leu	Ala	Asn	Leu	Ser	Phe	Thr	Asp	Leu	Phe	Phe	Val
	1				5					10					15	

25

	Thr	Asn	Thr	Ile	Pro	Lys	Met	Leu	Val	Asn	Leu	Gln	Ser	His	Asn	Lys
				20					25					30		

	Ala	Ile	Ser	Tyr	Ala	Gly	Cys	Leu	Thr	Gln	Leu
			35					40			

30

<210> 328

<211> 43

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLF07I GPCR TM2

40

<400> 328

	Met	Tyr	Leu	Phe	Leu	Ser	Asn	Leu	Ser	Phe	Ser	Asp	Leu	Cys	Phe	Ser
	1				5					10					15	

45

	Ser	Val	Thr	Ile	Pro	Lys	Leu	Leu	Gln	Asn	Met	Gln	Asn	Gln	Asp	Pro
				20					25					30		

	Ser	Ile	Pro	Tyr	Ala	Asp	Cys	Leu	Thr	Gln	Met
			35					40			

50

<210> 329

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> OLF07J GPCR TM2

60

<400> 329

	Met	Tyr	Phe	Phe	Leu	Ser	Met	Leu	Ser	Thr	Ser	Glu	Thr	Val	Tyr	Thr
	1				5					10					15	

65

	Leu	Val	Ile	Leu	Pro	Arg	Met	Leu	Ser	Leu	Val	Gly	Met	Ser	Gln
				20					25				30		

	Pro	Met	Ser	Leu	Ala	Gly	Cys	Ala	Thr	Gln	Met
			35					40			

ES 2 299 242 T3

<210> 330

<211> 43

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFOR3mouse GPCR TM2

10 <400> 330

```

      Met Tyr Phe Phe Leu Ser Asn Leu Ser Ser Leu Asp Leu Ala Phe Thr
      1      5      10      15
15    Thr Ser Ser Val Pro Gln Met Leu Lys Asn Leu Trp Gly Pro Asp Lys
      20      25      30
      Thr Ile Ser Tyr Gly Gly Cys Val Thr Gln Leu
      35      40

```

20 <210> 331

<211> 43

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFrat GPCR TM2

30 <400> 331

```

      Met Tyr Tyr Phe Leu Ser Ser Leu Ser Phe Val Asp Leu Cys Tyr Ser
      1      5      10      15
35    Thr Val Ile Thr Pro Lys Met Leu Val Asn Phe Leu Gly Lys Lys Asn
      20      25      30
      Phe Ile Thr Tyr Ser Glu Cys Met Ala Gln Phe
      35      40

```

40 <210> 332

<211> 43

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFF3rat GPCR TM2

50 <400> 332

```

      Met Tyr Phe Phe Leu Ser Asn Leu Ser Phe Val Asp Ile Cys Phe Ile
      1      5      10      15
55    Ser Thr Thr Val Pro Lys Met Leu Val Asn Ile Gln Thr Gln Asn Asn
      20      25      30
      Val Ile Thr Tyr Ala Gly Cys Ile Thr Gln Ile
      35      40

```

60 <210> 333

<211> 43

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFF5rat GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 333

```

      Met Tyr Phe Phe Leu Ser Asn Leu Ser Phe Val Asp Val Cys Phe Ser
      1      5      10      15
5      Ser Thr Thr Val Pro Lys Val Leu Ala Asn His Ile Leu Gly Ser Gln
      20      25      30
      Ala Ile Ser Phe Ser Gly Cys Leu Thr Gln Leu
      35      40

```

10 <210> 334

<211> 43

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFF6rat GPCR TM2

20 <400> 334

```

      Met Tyr Phe Phe Leu Cys Asn Leu Ser Phe Leu Glu Ile Trp Phe Thr
      1      5      10      15
25      Thr Ala Cys Val Pro Lys Thr Leu Ala Thr Phe Ala Pro Arg Gly Gly
      20      25      30
      Val Ile Ser Leu Ala Gly Cys Ala Thr Gln Met
      35      40

```

30 <210> 335

<211> 43

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFF12rat GPCR TM2

40 <400> 335

```

      Met Tyr Phe Phe Leu Ala Asn Leu Ser Phe Val Asp Ile Cys Phe Thr
      1      5      10      15
45      Ser Thr Thr Ile Pro Lys Met Leu Val Asn Ile Tyr Thr Gln Ser Lys
      20      25      30
      Ser Ile Thr Tyr Glu Asp Cys Ile Ser Gln Met
      35      40

```

50 <210> 336

<211> 43

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFI3rat GPCR TM2

60 <400> 336

```

      Met Tyr Leu Phe Leu Ser Asn Leu Ser Phe Ser Asp Leu Cys Phe Ser
      1      5      10      15
      Ser Val Thr Met Pro Lys Leu Leu Gln Asn Met Arg Ser Gln Asp Thr
      20      25      30
65      Ser Ile Pro Tyr Gly Gly Cys Leu Ala Gln Thr
      35      40

```

ES 2 299 242 T3

<210> 337

<211> 47

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFI7rat GPCR TM2

10 <400> 337

```

      Met Tyr Phe Phe Leu Ala Asn Met Ser Phe Leu Glu Ile Trp Tyr Val
      1      5      10      15
15    Thr Val Thr Ile Pro Lys Met Leu Ala Gly Phe Ile Gly Ser Lys Glu
      20      25      30
      Asn His Gly Gln Leu Ile Ser Phe Glu Ala Cys Met Thr Gln Leu
      35      40      45

```

20 <210> 338

<211> 43

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFI8rat GPCR TM2

30 <400> 338

```

      Met Tyr Leu Phe Leu Ser Asn Leu Ser Phe Ser Asp Leu Cys Phe Ser
      1      5      10      15
35    Ser Val Thr Met Leu Lys Leu Leu Gln Asn Ile Gln Ser Gln Val Pro
      20      25      30
      Ser Ile Ser Tyr Ala Gly Cys Leu Thr Gln Ile
      35      40

```

40 <210> 339

<211> 43

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> OLFI9rat GPCR TM2

50 <400> 339

```

      Met Tyr Leu Phe Leu Ser Asn Leu Ser Phe Ala Asp Leu Cys Phe Ser
      1      5      10      15
55    Ser Val Thr Met Pro Lys Leu Leu Gln Asn Met Gln Ser Gln Val Pro
      20      25      30
      Ser Ile Pro Tyr Ala Gly Cys Leu Ala Gln Ile
      35      40

```

60 <210> 340

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> OLFI14rat GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 340
 Met Tyr Leu Phe Leu Ser Asn Leu Ser Phe Ser Asp Leu Cys Phe Ser
 1 5 10 15
 5 Ser Val Thr Met Pro Lys Leu Leu Gln Asn Met Gln Ser Gln Val Pro
 20 25 30
 Ser Ile Ser Tyr Thr Gly Cys Leu Thr Gln Leu
 35 40
 10 <210> 341
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> OLF115rat GPCR TM2
 20 <400> 341
 Met Tyr Leu Phe Leu Ser Asn Leu Ser Phe Ser Asp Leu Cys Phe Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Thr Met Pro Lys Leu Leu Gln Asn Met Gln Ser Gln Val Pro
 20 25 30
 25
 Ser Ile Pro Phe Ala Gly Cys Leu Thr Gln Leu
 30 35 40
 <210> 342
 <211> 43
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> OLFOR17_40 GPCR TM2
 40 <400> 342
 Met Tyr Phe Phe Leu Gly Asn Leu Ser Val Leu Asp Val Gly Cys Ile
 1 5 10 15
 45 Ser Val Thr Val Pro Ser Met Leu Ser Arg Leu Leu Ser Arg Lys Arg
 20 25 30
 Ala Val Pro Cys Gly Ala Cys Leu Thr Gln Leu
 35 40
 50 <210> 343
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> GUST27rat GPCR TM2
 60 <400> 343
 Met Tyr Phe Phe Leu Ser Asn Leu Ser Phe Val Asp Ile Cys Phe Ile
 1 5 10 15
 Ser Thr Thr Ile Pro Lys Met Leu Val Asn Ile His Ser Gln Thr Lys
 20 25 30
 65 Asp Ile Ser Tyr Ile Glu Cys Leu Ser Gln Val
 35 40

ES 2 299 242 T3

<210> 344

<211> 42

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> RPE GPCR TM2

10 <400> 344

```

      Cys His Leu Leu Val Leu Ser Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Ile Ser
      1      5      10      15
15    Leu Asn Ala Leu Val Ala Ala Thr Ser Ser Leu Leu Arg Arg Trp Pro
      20      25      30
      Tyr Gly Ser Asp Gly Cys Gln Ala His Gly
      35      40

```

20 <210> 345

<211> 41

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HHRF1 GPCR TM2

30 <400> 345

```

      Gly Asp Val Tyr Phe Ile Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu Leu Phe Val
      1      5      10      15
35    Cys Thr Leu Pro Leu Trp Met Gln Tyr Leu Leu Asp His Asn Ser Leu
      20      25      30
      Ala Ser Val Pro Cys Thr Leu Leu Thr
      35      40

```

40 <210> 346

<211> 42

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HHRF2 GPCR TM2

50 <400> 346

```

      Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Ile Val
      1      5      10      15
55    Val Gly Leu Pro Phe Phe Leu Glu Tyr Ala Lys His His Pro Lys Leu
      20      25      30
      Ser Arg Glu Val Val Cys Ser Gly Leu Asn
      35      40

```

60 <210> 347

<211> 41

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> HHRF3 GPCR TM2

ES 2 299 242 T3

<400> 347

```

      Pro Thr Ile Tyr Met Thr Asn Leu Tyr Ser Thr Asn Phe Leu Thr Leu
      1           5           10           15
5      Thr Val Leu Pro Phe Ile Val Leu Ser Asn Gln Trp Leu Leu Pro Ala
      20           25           30
      Gly Val Ala Ser Cys Lys Phe Leu Ser
      35           40

```

10 <210> 348

<211> 41

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> MCP-1A y MCP-1B GPCR TM2

20 <400> 348

```

      Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu
      1           5           10           15
25     Ile Thr Leu Pro Leu Trp Ala His Ser Ala Ala Asn Glu Trp Val Phe
      20           25           30
      Gly Asn Ala Met Cys Lys Leu Phe Thr
      35           40

```

30 <210> 349

<211> 41

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> PPR1bovine GPCR TM2

40 <400> 349

```

      Thr Asp Val Tyr Ile Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Leu Phe Leu Leu
      1           5           10           15
45     Phe Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val Asn Ala Val His Gly Trp Val Leu
      20           25           30
      Gly Lys Ile Met Cys Lys Val Thr Ser
      35           40

```

50 <210> 350

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> F-1-5 GPCR CXCR4

<221> MOD_RES

60 <222> (18)...(18)

<223> Xaa = valinamida

<400> 350

```

65     Asp Asp Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile Phe Leu Thr Gly
      1           5           10           15
      Ile Xaa

```

ES 2 299 242 T3

<210> 351
 <211> 22
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> F-2-1 GPCR CXCR4
 10 <400> 351

 Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val Asp Ala Val Ala
 1 5 10 15
 15 Asn Trp Tyr Phe Gly Asn
 20

 <210> 352
 20 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> F-3-1 GPCR CXCR4
 <221> MOD_RES
 <222> (23)...(23)
 30 <223> Xaa = leucinamida
 <400> 352

 Lys Ala Val His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu
 1 5 10 15
 Ile Leu Ala Phe Ile Ser Xaa
 20

 40 <210> 353
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> F-4-1 GPCR CXCR4

 50 <400> 353
 Lys Val Tyr Val Gly Val Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro
 1 5 10 15
 Asp Phe Ile Phe
 20
 55
 <210> 354
 <211> 21
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> F-5-1 GPCR CXCR4
 65 <221> MOD_RES
 <222> (21)...(21)
 <223> Xaa = isoleucinamida

ES 2 299 242 T3

<400> 354

	His	Ile	Met	Val	Gly	Leu	Ile	Leu	Pro	Gly	Ile	Val	Ile	Leu	Ser	Cys
	1				5					10					15	
5	Tyr	Cys	Ile	Ile	Xaa											
					20											

<210> 355
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> F-7-1 GPCR CXCR4
 <221> MOD_RES
 <222> (20)...(20)
 <223> Xaa = lisinamida

<400> 355

	Ala	Leu	Ala	Phe	Phe	His	Cys	Cys	Leu	Asn	Pro	Ile	Leu	Tyr	Ala	Phe
	1				5					10					15	
25	Leu	Gly	Ala	Xaa												
				20												

<210> 356
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> segundo dominio de transmembrana de CXCR4

<400> 356

	His	Leu	Ser	Val	Ala	Asp	Leu	Leu	Phe	Val	Ile	Thr	Leu	Pro	Phe	Trp
	1				5					10					15	

45	Ala	Val	Asp	Ala	Val	Ala	Asn	Trp	Tyr	Phe	Gly	Asn	Phe	Leu	Cys	Lys
				20					25					30		

<210> 357
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> F-2-8 GPCR CXCR4

<400> 357

	Leu	Leu	Phe	Val	Ile	Thr	Leu	Pro	Phe	Trp	Ala	Val	Asp	Ala	Val	Ala
	1				5					10					15	
60	Asn	Trp	Tyr	Phe	Gly	Asn	Lys	Lys								
				20												

<210> 358
 <211> 21
 <212> PRT

ES 2 299 242 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> F-2-4 GPCR CXCR4

5

<400> 358

	Val	Ile	Thr	Leu	Pro	Phe	Trp	Ala	Val	Asp	Ala	Val	Ala	Asn	Trp	Tyr
	1				5					10					15	
10	Phe	Gly	Asn	Lys	Lys											
				20												

<210> 359

<211> 19

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> AcF-2-5 GPCR CXCR4

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa = Leu acetilada

25

<400> 359

	Xaa	Leu	Phe	Val	Ile	Thr	Leu	Pro	Phe	Trp	Ala	Val	Asp	Ala	Val	Ala
	1				5					10					15	
30	Asn	Asp	Asp													

<210> 360

<211> 24

35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> F-2-6 GPCR CXCR4

40

<400> 360

	Leu	Ser	Val	Ala	Asp	Leu	Leu	Phe	Val	Ile	Thr	Leu	Pro	Phe	Trp	Ala
	1				5					10					15	

45

	Val	Asp	Ala	Val	Ala	Asn	Asp	Asp
				20				

50

<210> 361

<211> 27

55

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Rhod-AcF-2-2 GPCR CXCR4

60

<221> MOD_RES

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Leu acetilada

65

<221> MOD_RES

<222> (26)...(26)

<223> Xaa = rodamina unida a Lys

ES 2 299 242 T3

<400> 361

5 Xaa Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val Asp Ala Val
1 5 10 15
Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Asp Asp Xaa Asp
20 25

<210> 362

<211> 28

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> CCKAR-TM-4-2 (#71) GPCR CCKAR

<400> 362

20 Val Ile Ala Ala Thr Trp Cys Leu Ser Phe Thr Ile Met Thr Pro Tyr
1 5 10 15
Pro Ile Tyr Ser Asn Leu Val Pro Phe Thr Asp Asp
20 25

25 <210> 363

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> CCKAR-TM-5-3 (#45) GPCR CCKAR

<400> 363

35 Asp Asp Gln Thr Phe Leu Leu Leu Ile Leu Phe Leu Leu Pro Gly Ile
1 5 10 15
Val Met Val Val Ala Tyr Gly Leu
20

40

45

50

55

60

65