



**Découverte de modulateurs allostériques
peptidiques de récepteurs
transmembranaires :
focus sur la sélectivité fonctionnelle**

*Discovery of new allosteric peptidic modulators of transmembranous receptors : Focus
on functional selectivity*

¹Christiane Quiniou, ³Eugénie Goupil, ²William Lubell, ³Stéphane Laporte ¹Sylvain
Chemtob*

¹Département de Biochimie, Université de Montréal, Centre de recherche Hôpital Sainte-Justine;
²Département de Chimie, Université de Montréal; ³Département de pharmacologie et thérapeutique,
Université McGill

*Toute correspondance doit être adressée à
Dr. Sylvain Chemtob Hôpital Sainte-Justine
Centre de recherche 3175, chemin de la
Côte-Sainte-Catherine H3T 1C5 local 2709
Montréal, Canada
Courriel : sylvain.chemtob@gmail.com
Téléphone : 514-345-4931 poste 2978

Article reçu le : 12 avril 2012

Article accepté le : 01 juin 2012



Sylvain Chemtob



Résumé

La capacité des modulateurs allostériques d'affecter sélectivement la signalisation découlant de l'activation des protéines (par exemple des récepteurs) en fait une nouvelle classe d'agents thérapeutiques pouvant intervenir de façon ciblée et efficace. Nous avons développé de petits peptides modulateurs allostériques (peptidiques de conformation D) reproduisant des portions de régions spécialement choisies à l'extérieur du domaine de liaison du ligand orthostérique, dans les régions interdomaines, la portion juxtamembranaire ou dans les boucles des récepteurs IL-1R/IL-1RAcP (récepteur de l'interleukine 1), FP (récepteur de la prostaglandine F2 α) et V2R (récepteur de type 2 de la vasopressine). Ces peptides ont démontré un mécanisme de sélectivité fonctionnelle caractéristique des modulateurs allostériques.

Summary

The potential of allosteric modulators to selectively affect the signalling following the activation of a targeted protein (such as a receptor) is probably the most promising pharmacological property of this new class of therapeutic agents. We have developed small peptidic allosteric modulators (D-peptide conformation) reproducing portions of flexible regions selected precisely outside the orthosteric binding site and into interdomains, juxtamembranous or loops regions of IL-1R/IL-1RAcP receptor (interleukin receptor 1), FP (prostaglandin F2 α receptor) and V2R (vasopressin receptor). *In vitro* and *in vivo* characterization of these peptides revealed functional selectivity and a binding site distinct from that of the orthosteric ligand, characteristic of allosteric modulators.



Historique

Depuis que R.P. Stephenson a défini l'efficacité en 1956 [1] en étudiant les effets de composés possédant des propriétés analogues à l'acétylcholine, la recherche en développement de médicaments a surtout mis l'accent sur des inhibiteurs orthostériques qui, par définition, entrent en compétition avec les ligands naturels des récepteurs pour le même site de liaison et qui bloquent ainsi certaines voies de signalisation qui auraient intérêt à demeurer actives. Ces dernières années ont été présentés de nouveaux concepts concernant la modulation de l'activité des récepteurs et l'aspect dynamique et allostérique des interactions protéines-protéines. Ils ouvrent la voie à la conception de médicaments se liant à un site différent du site de liaison du ligand naturel et pouvant affecter sélectivement des voies particulières de signalisation, donnant ainsi naissance à des thérapeutiques plus efficaces, sélectives et puissantes.

L'élaboration de la théorie allostérique s'est véritablement amorcée entre les années 1961 et 1965. Jacques Monod et son équipe ont introduit le terme « allostérie » (du grec *allos stereos*, signifiant « autre site ») dans le vocabulaire

de la chimie des protéines pour décrire la présence de sites de liaison pour des molécules modulatrices de l'activité. Le modèle MWC (Monod, Wyman, Changeux) en 1965 [2] proposait qu'une protéine existe en différentes conformations, dont certaines sont actives et d'autres inactives, et qu'un ligand se liant à l'une de ces conformations favorise le déplacement de l'équilibre vers celle-ci et de ce fait en augmente le nombre (conformations sélectionnées). Les premières tentatives de modéliser les interactions allostériques se sont poursuivies avec le modèle de Koshland *et al* (KNF) (1966) [3], qui décrivait les interactions entre un substrat et une enzyme et proposait que la liaison au site actif changeait la structure de l'enzyme (conformation induite). À partir de la découverte des protéines G [4], les modèles ligand-récepteur ont décrit la relation récepteurs-protéines G comme étant de type allostérique puisque celles-ci se lient à un site autre que le site orthostérique [5]. Le modèle d'antagonisme allostérique de F.J. Ehler [6] fut le premier modèle à introduire de façon formelle la sélectivité fonctionnelle et la différence de réponse dépendante de l'agoniste et du modulateur allostérique.



Les dernières avancées technologiques en matière de découverte et de caractérisation de nouveaux composés nous ont fait comprendre la réelle complexité de la dynamique ligand-récepteur et de la réponse biologique s'y rapportant. Les récepteurs ne fonctionnent pas comme des interrupteurs ouverts ou fermés mais doivent plutôt être vus comme des structures dynamiques capables d'adopter tout un éventail d'états conformationnels [7].

Au cours des vingt dernières années, des études de résonance magnétique (^{15}N et résonance paramagnétique) et de fluorescence chez le récepteur β 2-adrénérique et la rhodopsine [8, 9] ont illustré la flexibilité et la multitude de conformations qu'une même protéine peut adopter, contrairement à ce que suggéraient jusqu'alors les résultats de cristallographie et les modèles théoriques. Des méthodes comme le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) et le BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) ont confirmé qu'une corrélation existe entre les changements

conformationnels et les changements fonctionnels observés avec différents ligands pour un même récepteur [10].

La nouvelle vision de l'allostérisme reconnaît désormais que les protéines préexistent en tant qu'ensembles de populations de conformères. Ces conformères se replient et se déplient continuellement de façon localisée, ce qui résulte en un nombre important de structures différant légèrement les unes des autres. La liaison d'un effecteur allostérique (sur un complexe ligand-récepteur ou sur une protéine seule) mène à un déplacement de l'équilibre et à un changement dans la composition des populations de conformères [11]. Selon cette nouvelle compréhension, la modulation allostérique peut comporter des micro-changements de conformations, difficilement détectables [12], qui influencent l'activité biologique contrôlée par un récepteur et mènent à une modulation différente de la signalisation induite par la liaison d'un ligand orthostérique, c'est-à-dire à une sélectivité fonctionnelle.



La sélectivité fonctionnelle, une propriété pharmacologique essentielle des modulateurs allostériques

L'efficacité d'un ligand à générer un effet biologique était auparavant considérée comme linéaire et uniforme. Un agoniste lié à un récepteur au site orthostérique générerait donc toute la gamme de signaux associés à ce récepteur. La signalisation de plusieurs récepteurs étant partiellement connue, l'évaluation de l'efficacité d'un composé consistait souvent à ne considérer que le paramètre classique validé dans la littérature.

Ces dernières années, certains agonistes des récepteurs de la dopamine et de la sérotonine ont démontré des activités pouvant être agonistes ou antagonistes en fonction des effets considérés. Ainsi, le récepteur de l'angiotensine [13], AT₁AR, signale différemment si le ligand présent est l'angiotensine ou son dérivé SII. Ce dernier ne peut activer la protéine G α q, mais induit l'internalisation du récepteur et active la voie des MAPK, ce qui génère un effet cardioprotecteur ouvrant des perspectives pharmacologiques intéressantes. Un

agoniste du récepteur ATIIR, TRV120027, génère le même profil signalitique. Ces travaux décrivaient en fait ce que Terry Kenakin, en 1995, appellera « signalisation biaisée » ou « sélectivité fonctionnelle » [14].

Les modulateurs allostériques possèdent plusieurs propriétés intéressantes au niveau pharmacologique. La saturation de leurs effets découle du fait que le ligand allostérique n'occupe pas le site de liaison orthostérique et parvient donc rapidement à la saturation des sites de liaison, ce qui rend quasi inexistantes les risques de surdose. Au contraire, un modulateur orthostérique entre en compétition avec le ligand naturel pour le site de liaison et l'effet dépend directement de la quantité respective des deux ligands. La localisation du site de liaison des modulateurs allostériques leur confère aussi une plus grande sélectivité. Habituellement, les sites allostériques se retrouvent dans des régions stabilisatrices non conservées de la protéine. Mais la propriété de loin la plus intéressante en pharmacologie est la sélectivité fonctionnelle [15]. Cette propriété élimine par exemple l'accoutumance aux médicaments dans le traitement d'affections chroniques et permet d'éviter le blocage de



certaines voies de signalisation bénéfiques. Une inhibition compétitive et totale (antagoniste orthostérique) de la signalisation peut être préjudiciable, alors qu'un inhibiteur allostérique pourrait être capable de bloquer uniquement les voies responsables des signaux cellulaires pathologiques. Il y a habituellement un état qui est favorisé thermodynamiquement par le ligand allostérique, ce qui module positivement ou négativement certaines voies de signalisation [7].

Il existe quelques exemples de composés allostériques qui ont été caractérisés et qui ont démontré de la sélectivité fonctionnelle. L'aplaviroc [16] n'a pas d'effet sur l'affinité de la chimiokine RANTES (CCL5) pour le récepteur CCR5, mais il inhibe la réponse pharmacologique induite (mobilisation calcique). Par contre, l'aplaviroc ne bloque pas la réponse à un autre ligand du même récepteur, MIP-1 α . La neurokinine NKA induit l'activation des protéines G α s et G α q lorsqu'elle se lie au récepteur NK. Le composé LP1805 se lie à NK1 sur un site différent de NKA et activerait uniquement la protéine G α q en inhibant le couplage à G α s [17]. Un autre exemple s'applique au composé AC-42, qui inhibe uniquement l'internalisation du

récepteur M $_1$ Ach mais non la réponse biologique [18].

Conception de modulateurs peptidiques allostériques

Des séquences peptidiques dérivées des séquences primaires des protéines (soit de l'interface entre deux sous-unités ou dimères, soit entre deux régions intramoléculaires) ont déjà été utilisées avec succès pour inhiber l'activité biologique de plusieurs récepteurs [19-21] en interférant avec leur assemblage ou leur conformation. Étant donné que ces régions sont situées à des endroits différents des sites de liaison orthostériques, ces peptides s'avèrent être des antagonistes non compétitifs pouvant moduler l'activité biologique des récepteurs – des caractéristiques qui correspondent à celles d'un modulateur allostérique [7].

L'approche utilisée par notre laboratoire dans le but de concevoir de petits peptides modulateurs (composés d'acides aminés de conformation d) ayant des propriétés allostériques a donc consisté à reproduire de petites parties des portions extracellulaires flexibles et des boucles des récepteurs de façon à ce qu'ils interagissent en s'interposant entre deux sous-unités ou entre deux régions de la même sous-unité.



Ces régions ont été spécialement choisies à l'extérieur du domaine de liaison du ligand orthostérique dans les régions interdomaines, la portion juxtamembranaire ou dans les boucles (régions flexibles) des récepteurs IL-1R/IL-1RAcP (récepteur de l'interleukine 1), FP (récepteur de la prostaglandine F₂ α) et le V2R (récepteur type 2 de la vasopressine).

Étant donné que les boucles sont exposées durant les changements de conformation, notre hypothèse était qu'une séquence peptidique reproduisant certaines régions de ces boucles pourrait déplacer l'équilibre de l'ensemble vers un état particulier et modulerait la signalisation. Certaines voies de signalisation pourraient être partiellement inhibées ou potentialisées tandis que d'autres ne seraient pas touchées puisque le ligand orthostérique pourrait toujours se lier au récepteur pour induire la signalisation correspondante à ce conformère.

Peptides modulant l'activité de récepteurs couplés aux protéines G

Un grand nombre de régions importantes pour l'activation et l'activité des récepteurs couplés aux protéines G ont été identifiées [22]. Parmi ces régions, la seconde boucle extracellulaire a fait l'objet de recherches concernant son rôle dans la liaison du ligand orthostérique et, dans l'activation des récepteurs. Les résidus situés à l'interface de la région extracellulaire qui pouvaient potentiellement faire partie de sites allostériques, particulièrement ceux situés près du site de liaison au ligand [22], ont aussi fait l'objet d'études plus approfondies. . Nous avons donc reproduit les régions juxtamembranaires de deux récepteurs couplés aux protéines G, le récepteur FP (prostaglandine F₂ α) et le récepteur de la vasopressine V2R, et vérifié leurs effets sur l'activité biologique.



*Récepteur de la prostaglandine
F_{2α} (FP) : activité des
modulateurs THG113 et
PDC113.824*

Les prostaglandines (PG), dont la synthèse est sous la gouverne de la cyclooxygénase et des prostaglandines synthases spécifiques, jouent un rôle important dans plusieurs états physiologiques et pathologiques, y compris durant la grossesse et l'accouchement [23]. Les prostaglandines sont les initiateurs du déclenchement du travail et agissent par l'intermédiaire des récepteurs couplés aux protéines G. En particulier, la prostaglandine PGF_{2α} promeut la contraction myométriale par l'activation du récepteur FP [23]. Le récepteur de PGF_{2α}, couplé à la protéine G_{αq}, induit la mobilisation calcique intracellulaire par l'accumulation d'inositol phosphate et l'activation de la protéine kinase C (PKC). Il a aussi été démontré que l'activation de FP induisait la réorganisation du cytosquelette dépendante de la protéine Rho et que ces deux voies de signalisation participaient à la contraction myométriale (**Figure 1B**). À partir d'un premier criblage *in vitro*, nous avons identifié un peptide, THG113 (ilghrdyk), dont la structure est

dérivée de la région N-terminale de la 2^e boucle extracellulaire du récepteur FP, qui possède une activité tocolytique. À partir de la structure de ce peptide, nous avons développé un peptidomimétique, PDC113.824 (**Figure 1A**), qui est sélectif du récepteur FP et agit comme un modulateur allostérique en démontrant une sélectivité fonctionnelle par rapport à la signalisation du récepteur FP [24]. *In vivo*, PDC113.824 retarde le début du travail induit par PGF_{2α} ou le LPS chez les souris CD-1 gestantes (**Figure 1C**). *In vitro*, PDC113.824 interfère de manière minime sur l'activation de la protéine G_{αq}, mais agit plutôt comme un modulateur négatif en inhibant l'activation de la protéine G_{α12} et de ce fait inhibe la voie Rho kinase (ROCK) (**Figures 1D et 1E**) qui gouverne la réorganisation du cytosquelette. Par ailleurs, PDC113.824 agit comme un modulateur allostérique positif en amplifiant l'activation de la PKC et de Erk1/2 induite par PGF_{2α} (**Figure 1F**). Cette sélectivité dans la modulation s'explique par un couplage plus efficace à la protéine G_{αq} qu'à la protéine G_{α12}. Par conséquent, PDC113.824 présente des propriétés de sélectivité pharmacologique sur différentes voies de signalisation induite par la prostaglandine F_{2α}.

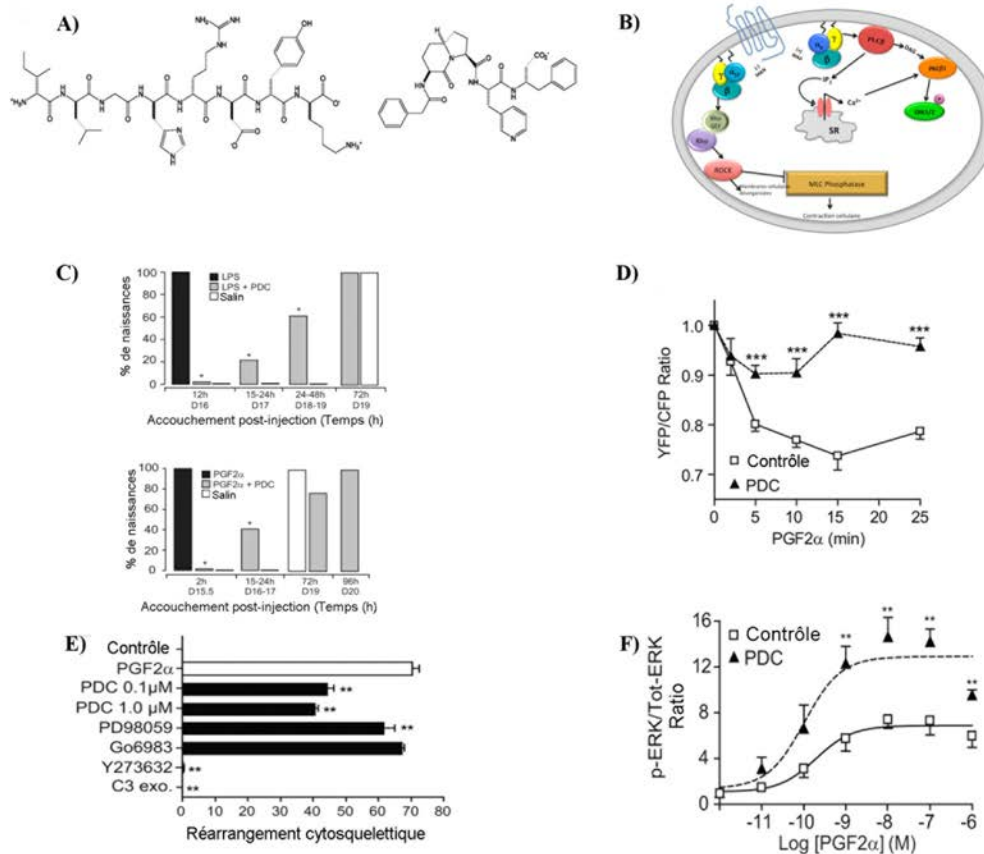


Figure 1

PDC113.824 démontre de la sélectivité fonctionnelle vis-à-vis du récepteur FP

A) Structure de THG113 (ilghrdyk) et de son dérivé peptidomimétique PDC113.824.

B) Signalisation lors de l'activation du récepteur par PGF2 α .

C) Action tocolytique de PDC113.824 chez la souris gestante suite à l'administration de LPS ou PGF2 α .

D) Activation de Rho GTPase déterminée par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert). L'activation de Rho diminue le signal FRET. PDC113.824 empêche l'activation;

E) PDC113.824 inhibe la réorganisation du cytosquelette induite par PGF2 α dans les cellules myométriales (PD98058 inhibiteur de MEK1, Go6983 inhibiteur de PKC, Y273632 et C3 exoenzyme inhibiteurs de Rho kinase);

F) PDC113.824 potentialise la phosphorylation des kinases Erk1/2 dans les cellules myométriales. Résultats tirés de la référence [24].



VRQ397 : un modulateur du récepteur de la vasopressine V_{2R}

L'arginine vasopressine (AVP) est un neuropeptide exerçant un effet sur la circulation et l'homéostasie hydrique corporelle. L'AVP agit par l'intermédiaire de trois récepteurs couplés aux protéines G, dont le V_{2R}, qui est majoritairement exprimé sur l'épithélium du tubule rénal collecteur et qui médie les effets hydro-osmotiques de la vasopressine [25]. V_{2R} est aussi présent sur l'endothélium et médie une vasodilatation [26]. V_{2R} joue donc un rôle dominant dans la rétention d'eau et dans l'inhibition de la contractilité vasculaire. Avec la même approche que celle décrite ci-dessus pour le récepteur FP, nous avons conçu six petits peptides reproduisant les régions juxtamembranaires du récepteur V_{2R} (**Figure 2A**) [27]. Le plus efficace,

VRQ397 (cravky), a été davantage caractérisé. VRQ397 inhibe la vasorelaxation induite par la DDAVP (desmopressine (1-désamino-8-D-arginine vasopressine), ligand sélectif pour le V_{2R} (**Figure 2B**), et augmente la clairance d'eau. Ce peptide agit spécifiquement sur V_{2R} de façon non compétitive en occupant un site de liaison différent du site orthostérique et démontre très clairement une sélectivité fonctionnelle d'action. Il inhibe la génération de la prostacycline PGI₂ (**Figure 2C**) mais non le couplage à la protéine G α s et la formation subséquente d'AMP cyclique (**Figures 2D, 2E**); il n'inhibe pas non plus le recrutement de la β -arrestine 2 (**Figure 2F**). Le peptide VRQ397 démontre donc véritablement des propriétés de signalisation biaisée en lien avec la définition d'un modulateur allostérique.

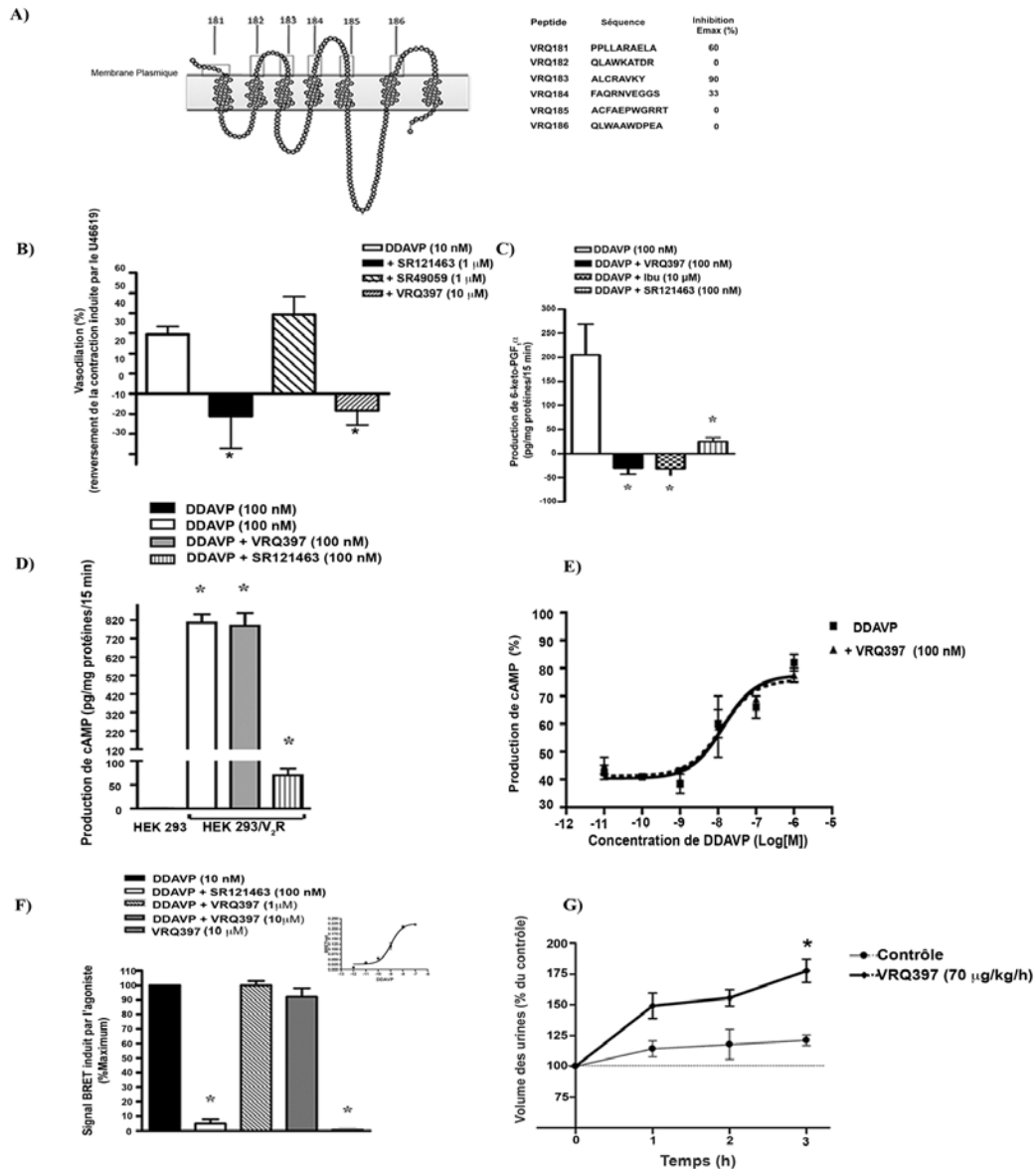


Figure 2 : Sélectivité fonctionnelle de VRQ397 vis-à-vis le récepteur V2R

A) Représentation graphique 2-D du récepteur de la vasopressine et emplacement des sites dont sont dérivés les peptides. Le tableau de droite indique la séquence et l'efficacité maximale des peptides à inhiber la vasodilatation induite sur le muscle crémastère de rat par la desmopressine, DDAVP.

B) Efficacité de VRQ397 à inhiber la vasodilatation, et **C)** la production de PGI₂

induite par le DDAVP dans le muscle crémastère de rat;

D) et E) VRQ397 n'a aucun effet ni sur la production d'AMP cyclique induite par le DDAVP dans des cellules exprimant V2R, ni sur **F)** le recrutement de la β-arrestine suite à l'activation du récepteur.

G) Effet diurétique de VRQ397 chez le rat [27].



*Modulateurs peptidiques
sélectifs au niveau fonctionnel
pour le récepteur de l'IL-1
(de type tyrosine kinasé)*

Le récepteur de l'interleukine-1 est composé de deux sous-unités, IL-1R et IL-1RAcP, qui est la protéine accessoire signalisatrice du complexe. L'IL-1RAcP interagit avec la sous-unité IL-1R qui forme un complexe avec l'IL-1 (IL-1R/IL-1) (**Figure 3A**). En nous basant sur cette information, nous avons conçu de petits peptides (≤ 12 acides aminés) qui reproduisent plusieurs régions de la protéine accessoire [28]. Parmi ces peptides, 101.10 (rytvela) inhibait certains effets biologiques de IL-1 β *in vitro* (ainsi qu'*in vivo*) et démontrait une modulation de ces effets et une sélectivité fonctionnelle en inhibant plus de 90 % de la prolifération des thymocytes mais seulement 30 à 35 % de la formation de PGE₂ (prostaglandine E₂) induite par l'IL-1 (**Figures 3C, 3E**); la séquence brouillée de rytvela (verytla) était inefficace. La séquence de 101.10 est située dans la portion juxtamembranaire de la protéine accessoire qui n'interagit pas avec le ligand.

En accord avec cette notion, rytvela (en employant [¹²⁵I]-rytvela) ne se lie pas au site orthostérique de liaison du substrat bien qu'il affecte légèrement l'affinité du ligand pour le récepteur. Ces caractéristiques le distingue de l'inhibiteur compétitif Kineret (IL-1Ra) [29]. *In vivo*, le peptide 101.10 injecté de façon intrapéritonéale inhibe l'inflammation du pavillon de l'oreille induite par l'injection sous-cutanée d'IL-1 β dans les souris CD-1 (**Figure 3F**).

Les autres peptides provenant de différentes régions (distinctes du site orthostérique) de l'IL-RAcP modulaient aussi différemment les effets biologiques de IL-1. Par exemple, les peptides 103, 106 et 108 affectaient de manière similaire au 101.10 la production de PGE₂ (**Figure 3C**), mais avaient des effets très différents sur la phosphorylation de p38 : par exemple, le peptide 103 augmentait la phosphorylation de p38 tandis que 101.10 l'inhibait totalement (**Figure 3D**). En somme, les peptides dérivés de la structure primaire de IL-1RAcP démontrent un mécanisme d'action correspondant à des modulateurs allostériques.

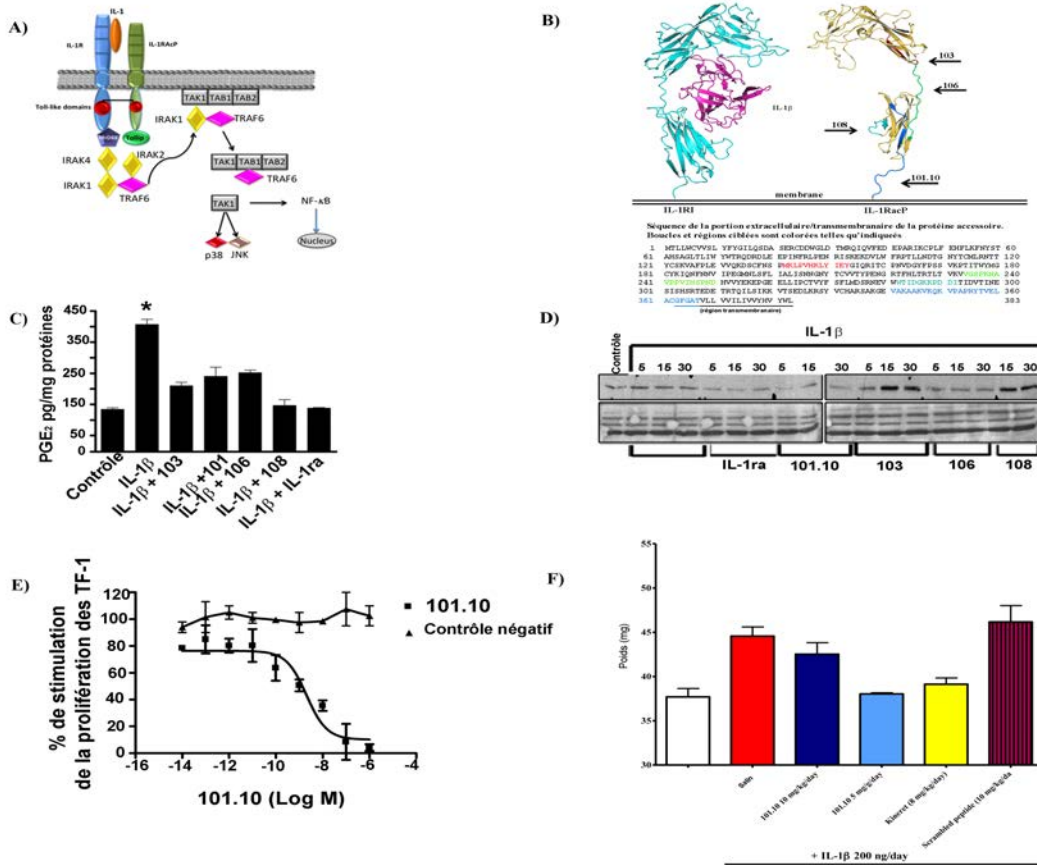


Figure 3.

Le peptide rytvela module les fonctions du récepteur IL-1R/IL-RACp activé par IL-1 de manière sélective.

A) Signalisation classique de IL-1 β . IL-1 β se lie à IL-1RI et l'ensemble recrute IL-1RIAcP. Le complexe recrute ensuite MyD88 ce qui induit la phosphorylation des kinases associées à IL-1R. Par la suite NF κ B est activé et pourra entrer dans le noyau afin d'induire l'expression d'autres marqueurs pro-inflammatoires tels l'IL-6, IL-8 et COX-2. TAK1 peut aussi activer les MAPK telles que Erk1/2, p38 et JNK (tiré de Dinarello, C 2009 [30]).

B) Séquence primaire de IL-1RAcP. Les séquences colorées correspondent aux boucles indiquées sur la structure: bleu: 101.10, turquoise: 108, vert: 106, rouge: 103.

C) Effets de 101.10 (rytvela [0.1 μ M]), et autres peptides dérivés de la séquence de la protéine accessoire et IL-1Ra (9 nM) sur la production de PGE₂ et **D)** sur la phosphorylation de p38 induite par IL-1 β (50 pM) dans des cellules TF-1;

E) Dose réponse de l'effet inhibiteur du 101.10 sur la prolifération des lymphocytes TF-1 induite par IL-1 β .

F) Le peptide 101.10 injecté de façon intrapéritonéale inhibe l'inflammation sur le pavillon d'oreilles qui est induite par l'injection sous-cutanée d'IL-1 β (200 ng) dans des souris CD-1 [28].



Conclusion

Les modulateurs allostériques représentent une voie prometteuse pour des applications thérapeutiques. L'utilisation de modulateurs allostériques peptidiques dérivés de séquences primaires pour moduler l'activité biologique représente une approche potentiellement intéressante pour cette nouvelle classe d'agents thérapeutiques. Les modulateurs allostériques comportent les avantages suivants : 1) moins d'effets secondaires dus aux propriétés de sélectivité fonctionnelle et de saturation de la réponse; 2) de par leur nature peptidique (et leurs acides aminés de stéréochimie *d*), ces composés sont non reconnus par les protéases; 3) les études d'activité-structure permettent de transformer ces peptides en petites molécules ayant des propriétés pharmacologiques et thérapeutiques supérieures aux peptides, comme la biodisponibilité orale et la durée d'action. Malgré ces avantages et l'identification de sélectivité pharmacologique et de propriétés allostériques avec plusieurs composés thérapeutiques déjà sur le marché, la

découverte systématique de modulateurs allostériques demeure un défi. Ce défi reflète nos connaissances limitées dans l'interaction des récepteurs avec les protéines adjacentes impliquées dans la signalisation, la relation entre les changements conformationnels des récepteurs et la signalisation désirée, ainsi que dans la signalisation spécifique et l'effet désiré *in vivo*.

Remerciements

Nous tenons à remercier Dr. Audrey Claing et son équipe pour les expériences sur le cytosquelette ainsi que Mme Hensy Fernandez et Mme Isabelle Lahaie pour l'assistance technique. Dr. Christiane Quiniou est récipiendaire d'une bourse d'excellence doctorale de la Fondation des maladies du cœur. Les travaux sur les récepteurs FP et V2R ont pu être effectués grâce au soutien des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) dans le cadre d'une subvention de groupe sur la régulation allostérique des récepteurs couplés aux protéines G (cTIGAR).



Références

1. Stephenson RP. 1956. A modification of receptor theory. *Br J Pharmacol Chemother* 11: 379-93
2. Monod J, Wyman J, Changeux JP. 1965. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* 12: 88-118
3. Koshland DE, Jr., Nemethy G, Filmer D. 1966. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5: 365-85
4. Gilman AG. 1984. G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* 36: 577-9
5. De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. 1980. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 255: 7108-17
6. Ehlert FJ. 1988. Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol* 33: 187-94
7. Kenakin TP. 2010. Ligand detection in the allosteric world. *J Biomol Screen* 15: 119-30
8. Peleg G, Ghanouni P, Kobilka BK, Zare RN. 2001. Single-molecule spectroscopy of the beta(2) adrenergic receptor: observation of conformational substates in a membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8469-74
9. Klein-Seetharaman J, Yanamala NV, Javeed F, Reeves PJ, Getmanova EV, Loewen MC, Schwalbe H, Khorana HG. 2004. Differential dynamics in the G protein-coupled receptor rhodopsin revealed by solution NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3409-13
10. Lohse MJ, Nikolaev VO, Hein P, Hoffmann C, Vilardaga JP, Bunemann M. 2008. Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 29: 159-65
11. Gunasekaran K, Ma B, Nussinov R. 2004. Is allostery an intrinsic property of all dynamic proteins? *Proteins* 57: 433-43
12. Tsai CJ, del Sol A, Nussinov R. 2008. Allostery: absence of a change in shape does not imply that allostery is not at play. *J Mol Biol* 378: 1-11
13. Violin JD, DeWire SM, Yamashita D, Rominger DH, Nguyen L, Schiller K, Whalen EJ, Gowen M, Lark MW. 2010. Selectively engaging beta-arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *J Pharmacol Exp Ther* 335: 572-9
14. Kenakin T. 1995. Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci* 16: 232-8
15. Kenakin T. 2007. Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 407-15
16. Watson C, Jenkinson S, Kazmierski W, Kenakin T. 2005. The CCR5 receptor-based mechanism of action of 873140, a potent allosteric noncompetitive HIV entry inhibitor. *Mol Pharmacol* 67: 1268-82
17. Maillet EL, Pellegrini N, Valant C, Bucher B, Hibert M, Bourguignon JJ, Galzi JL. 2007. A novel, conformation-specific allosteric inhibitor of the tachykinin NK2 receptor (NK2R) with functionally selective properties. *Faseb J* 21(9):2124-34.
18. Thomas RL, Mistry R, Langmead CJ, Wood MD, Challiss RA. 2008. G protein coupling and signaling pathway activation by m1 muscarinic acetylcholine receptor orthosteric and



- allosteric agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 327: 365-74
19. Peri KG, Quiniou C, Hou X, Abran D, Varma DR, Lubell WD, Chemtob S. 2002. THG113: a novel selective FP antagonist that delays preterm labor. *Semin Perinatol* 26: 389-97
20. Chalifour RJ, McLaughlin RW, Lavoie L, Morissette C, Tremblay N, Boule M, Sarazin P, Stea D, Lacombe D, Tremblay P, Gervais F. 2003. Stereoselective interactions of peptide inhibitors with the beta-amyloid peptide. *J Biol Chem* 278: 34874-81
21. Zhang TT, Cui B, Dai DZ, Tang XY. 2005. Pharmacological efficacy of CPU 86017 on hypoxic pulmonary hypertension in rats: mediated by direct inhibition of calcium channels and antioxidant action, but indirect effects on the ET-1 pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 46: 727-34
22. Kristiansen K. 2004. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 103: 21-80
23. Olson DM, Zaragoza DB, Shallow MC, Cook JL, Mitchell BF, Grigsby P, Hirst J. 2003. Myometrial activation and preterm labour: evidence supporting a role for the prostaglandin F receptor--a review. *Placenta* 24 Suppl A: S47-54
24. Goupil E, Tassy D, Bourguet C, Quiniou C, Wisehart V, Petrin D, Le Gouill C, Devost D, Zingg HH, Bouvier M, Saragovi HU, Chemtob S, Lubell WD, Claing A, Hebert TE, Laporte SA. 2010. A novel biased allosteric compound inhibitor of parturition selectively impedes the prostaglandin F2alpha-mediated Rho/ROCK signaling pathway. *J Biol Chem* 285: 25624-36
25. Holmes CL, Landry DW, Granton JT. 2004. Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 - clinical physiology. *Crit Care* 8: 15-23
26. Bichet DG. 2008. Vasopressin receptor mutations in nephrogenic diabetes insipidus. *Semin Nephrol* 28: 245-51
27. Rihakova L, Quiniou C, Hamdan FF, Kaul R, Brault S, Hou X, Lahaie I, Sapieha P, Hamel D, Shao Z, Gobeil F, Jr., Hardy P, Joyal JS, Nedev H, Duhamel F, Beauregard K, Heveker N, Saragovi HU, Guillon G, Bouvier M, Lubell WD, Chemtob S. 2009. VRQ397 (CRAVKY): a novel noncompetitive V2 receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R1009-18
28. Quiniou C, Sapieha P, Lahaie I, Hou X, Brault S, Beauchamp M, Leduc M, Rihakova L, Joyal JS, Nadeau S, Heveker N, Lubell W, Sennlaub F, Gobeil F, Jr., Miller G, Pshezhetsky AV, Chemtob S. 2008. Development of a novel noncompetitive antagonist of IL-1 receptor. *J Immunol* 180: 6977-87
29. Carter DB, Deibel MR, Jr., Dunn CJ, Tomich CS, Laborde AL, Slightom JL, Berger AE, Bienkowski MJ, Sun FF, McEwan RN, et al. 1990. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 344: 633-8
30. Dinarello CA. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27: 519-50