

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 224 367**

⑤① Int. Cl.7: **G01N 33/566**
G01N 33/74
C07K 16/28

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑧⑥ Número de solicitud europea: **98911331 .1**
⑧⑥ Fecha de presentación: **19.03.1998**
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0979410**
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2000**

⑤④ Título: **Procedimiento para determinar la activación del receptor de citocinas mediante el uso de un anticuerpo.**

③⑩ Prioridad: **19.03.1997 SE 9701010**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2005

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2005

⑦③ Titular/es: **Pharmacia Spain S.A.**
Carretera de Rubí, 90-100
08190 Sant Cugat de Vallés, Barcelona, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

⑦② Inventor/es: **Martínez Alonso, Carlos;**
Mellado García, José Mario;
Kremer Baron, Leonor y
Rodríguez Frade, José Miguel

⑦④ Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 224 367 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para determinar la activación del receptor de citocinas mediante el uso de un anticuerpo.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la activación del receptor de la hormona de crecimiento humana (hGHR) mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que se une al hGHR o hGHBP, y cuya unión no se inhibe con la hGH soluble y que está dirigido al epítipo conformacional situado en los subdominios articulados I y II de la región extracelular del hGHR y es capaz de discriminar entre un hGHR activado e inactivo.

10 El procedimiento comprende las siguientes etapas: poner en contacto el anticuerpo monoclonal y el hGHR para que formen un complejo, poner en contacto un ligando candidato con el complejo, medir la unión del anticuerpo al hGHR y de este modo, discriminar entre una conformación del hGHR activada y una inactiva.

Introducción

15 La hormona de crecimiento humana (hGH) polipeptídica de 22 kDa, esencial para un crecimiento y desarrollo normales, induce una variedad de efectos biológicos, incluido el crecimiento lineal, la lactancia, la retención de nitrógeno, efectos diabotogénicos y similares a los de la insulina y activación de macrófagos (1-4). Cada uno de estos efectos se inicia mediante la interacción de la hGH con receptores celulares específicos. El receptor de la hGH (hGHR) pertenece a una amplia familia de receptores de citocinas (5), en la que se incluyen los receptores de prolactina, eritropoyetina, interleucinas (IL) 2, 4 y 6, factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF) (6-10) y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). La organización en tres dominios de estos receptores comprende un dominio de unión a ligando, extracelular y con una abundante N-glucosilación, un único segmento transmembrana y un dominio intracelular, este último comparte poca identidad de secuencia en la familia (11). La región extracelular del hGHR tiene dos subdominios, uno implicado principalmente en la unión a la hGH (subdominio I) y el otro en la dimerización del hGHR (subdominio II) (7, 8).

El dominio extracelular de hGHR se encuentra en el suero en forma de una proteína de unión a hormonas (hGHBP) que se une a la hGH con aproximadamente la misma afinidad y especificidad que el receptor intacto (12). La hGHBP recombinante humana no glucosilada (13) tiene la misma afinidad de unión ($K_d = 0,4$ nM) (14) y especificidad por la hGH que la proteína de unión a mamíferos. En los estudios de cristalización de hGH y hGHBP muestran que una única molécula de hGH se une a dos moléculas de hGHBP (15). Cada molécula de hGH es divalente y contienen dos sitios distintos de unión a la hGHBP; el sitio I es un sitio de alta afinidad y el sitio II lo es de baja afinidad. Por el contrario, la hGHBP es monovalente, ya que usa los mismos aminoácidos para unirse al sitio I o al sitio II de la hGH. Un exceso de hGH disocia el complejo $hGH-(hGHBP)_2$ para formar un complejo monomérico. El desencadenamiento de la respuesta biológica requiere la unión secuencial de la subunidad del primer receptor al sitio I de una molécula de GH, seguido por la unión del segundo receptor al sitio II de la GH, formando el complejo $GH-(GHR)_2$ (16). Además de las interacciones hormona-receptor, también hay un contacto de superficie considerable entre las subunidades del subdominio II de las regiones extracelulares de las dos moléculas de receptor. Este modelo de dimerización secuencial se ha confirmado usando varios enfoques, incluidas cristalización, cromatografía de exclusión por tamaño, calorimetría y ensayos de inactivación por fluorescencia (14).

Aunque se conoce poco acerca del mecanismo de transducción de señal del hGHR, varias líneas de evidencia indican que la activación del hGHR desencadena la fosforilación de la tirosina de la JAK2 quinasa (17) y algunos factores de transcripción STAT, principalmente STAT 2, STAT3 Y STAT5 (18-21).

Los procedimientos previos para determinar si un ligando candidato es un agonista o un antagonista de un receptor de la hormona de crecimiento se han basado en la teoría de que se debe determinar si el ligando forma o no un complejo de uno o dos receptores de la hormona de crecimiento. Véase el documento WO 92/21029.

50 Sin embargo, Hardinger y col. en *J Biol Chem*, 1996, vol. 271 (12) 6708-12 han encontrado que la hGH y el hGH-G120R nativos forman complejos de tamaño similar al esperado para la hGH cuando se unen a la proteína de unión a hGH recombinante. Además concluyen con "nuestros resultados indican que el antagonista de la GH hGH-G120R es capaz de unirse, dimerizar e internalizar los GHR de forma similar a la de la hGH. Sin embargo, el complejo dimérico formado con hGH-G120R no es funcional como en el dímero hGH:GHR. Beattie y col. en *Euro. J of Biochemistry*, 1996, V239, N2, 479-486 identifican anticuerpos frente a un epítipo discontinuo del dominio extracelular del GHR bovino y la unión específica de tales anticuerpos policlonales.

60 Baumgartner y col. en *J of Biological Chemistry*, 1994, V269, N46 (nov. 18), 29094-29101 describen que los miembros de la familia de receptores de citocinas tienen una secuencia consenso WSXWS (motivo WS) en el dominio extracelular y en sus estudios también describen el uso de anticuerpos monoclonales específicos de conformación.

65 El documento US 5599681 describe un procedimiento para producir anticuerpo y se demuestra un procedimiento para discriminar entre el GHR fosforilado activo y el GHR no fosforilado inactivo usando anticuerpos que son capaces de identificar esta modificación química reversible.

El documento US 5470952 describe un antagonista de IL-6, capaz de unirse a la IL-6 para formar un complejo no funcional. Lobiet y col. en *J. of Biological Chemistry*, 1991, V266, N33, 22645-52 describen el uso de anticuerpos

monoclonales frente al dominio extracelular del receptor con el único propósito de identificar el mecanismo de GHR internalizado y su presencia en el núcleo celular. Además se ha propuesto que la GH puede regular la transcripción de genes específicos bien directa o bien indirectamente a través de la activación de la quinasa C nuclear.

5 El documento US 5506107 describe un procedimiento para determinar si un ligando candidato es antagonista de un ligando nativo y analiza tres anticuerpos diferentes (tres monoclonales; AcMo13E1, AcMo 263 y 3D9) con capacidad agonista de GHR.

10 En el presente documento, presentamos el nuevo hallazgo de que la medición de un cambio de conformación del receptor de GH es la medición adecuada para la determinación de si un ligando es un agonista o un antagonista del receptor de la hormona de crecimiento.

Abreviaturas usadas

15	EDC/NHS	Clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxisuccinimida
	EIA	Inmunoensayo ligado a enzimas
	SBF	Suero bovino fetal
	GAM-PO	Anticuerpo inmunoglobulina anti-ratón de cabra
20	G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
	GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos
	hGH	Hormona de crecimiento humana
	hGHBP	Proteína de unión a la hormona de crecimiento humana
25	hGHR	Receptor de la hormona de crecimiento humana
	IL-2, IL-4, IL-6	Interleucinas 2, 4 y 6
	PBS	Suero salino tamponado con fosfato
	PO	Peroxidasa
	OPD	Diclorhidrato de o-fenilendiamina
30	RAM	Anti-ratón de conejo
	sc	Subcutáneo
	SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico

35 Invención

Hemos desarrollado un panel de anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos del receptor de la hormona de crecimiento humana, que se usan para la caracterización de señales desencadenadas por la unión de hGH. En la presente se usó uno de ellos para caracterizar las interacciones hormona/receptor. Este anticuerpo, el GHR05, está dirigido 40 contra los subdominios articulados I y II de la región extracelular del receptor y reconoce el hGHR de la superficie de la célula que no está en forma de complejo. Los ensayos de unión indican que el GHR05 tiene una afinidad mayor por el complejo hGH-hGHR que por el hGHR solo, lo que indica que el AcMo reconoce mejor una conformación del receptor inducida tras la unión del ligando. La unión del anticuerpo al receptor de la superficie celular aumenta tras la unión del receptor a la hormona de crecimiento, pero no cuando se une a una forma mutante, hGHG120R, que 45 no desencadena la activación del receptor. Por tanto, parece que la unión de la hormona de crecimiento conduce a un cambio conformacional en el epítipo del receptor reconocido por GHR05 y da lugar a la configuración activa del dímero, necesaria para la transducción de señal. Por consiguiente, parece que el anticuerpo activa las células a través de cambios conformacionales, que son diferentes de los desencadenados por la GH.

50 Los ensayos de unión indican una afinidad mayor del GHR05 por el complejo hGH-hGHR que por el hGHR solo, lo que indica que el AcMo reconoce mejor una conformación del receptor inducida tras la unión del ligando.

55 Usando una línea celular murina dependiente de hormona de crecimiento en la que se expresan receptores quiméricos hemos encontrado que el GHR05 se une al receptor en ausencia de hGH y produce una señal que conduce a la proliferación celular, es decir a la activación. Por último, el tratamiento de células IM-9, una línea de células humanas que expresan un hGHR funcional, con GHR05 conduce a proliferación celular mediada por la generación de señales específicas para GH, incluyendo la fosforilación de la JAK2 tirosina quinasa y la activación de STAT5.

60 La invención se refiere a un procedimiento para determinar la activación del receptor de la hormona de crecimiento humana (hGHR) mediante el uso de la unión de un anticuerpo monoclonal al hGHR o a la hGHBP y cuya unión no se inhibe por la acción de hGH soluble, y que está dirigido al epítipo conformacional situado en los subdominios articulados I y II de la región extracelular del hGHR y es capaz de discriminar entre un hGHR activado y uno inactivo.

65 El procedimiento comprende las siguientes etapas: poner en contacto el anticuerpo monoclonal y el hGHR para formar un complejo, poner en contacto un ligando candidato con el complejo, medir la unión del anticuerpo al hGHR y de este modo discriminar entre una conformación de GHR activada y una inactiva.

ES 2 224 367 T3

La invención puede usarse para seleccionar un ligando capaz de activar o inactivar el hGHR, especialmente un agonista de la hormona de crecimiento humana (hGH) o un antagonista de la hGH.

Se podría añadir hGH.

La invención se define según las reivindicaciones adjuntas.

La unión del anticuerpo de se reivindica al GHR o a la GHBP no se inhibe con GH soluble y el anticuerpo tiene la capacidad para reconocer el GHR y la GHBP en un ensayo de inmunotransferencia de tipo western.

El anticuerpo también tiene la capacidad para reconocer, mediante citometría de flujo, todas las células que expresan GHR de forma natural o las células que se han sometido a transfección con un plásmido que contenía el gen que codifica el GHR. Otra capacidad es la de inmunoprecipitación del complejo BP-GH-1125.

Mediante esta invención es posible seleccionar compuestos con propiedades similares al GHR05.

Se desarrolló un AcMo específico del hGHR de igual isotipo, GHR19, que reconoce el monómero y desencadena la apoptosis.

Para analizar las consecuencias de la interacción hGHR/hGH probamos el efecto de GHR05 en células IM-9 que expresan hGHR y en la línea celular Ba/F3 (8/6). Estas últimas células se generaron a partir de la línea celular Ba/F3 pro-B murina dependiente de IL-3 (22) sometida a transfección con un gen quimérico que contiene el dominio extracitoplásmico del hGHR y el dominio intracitoplásmico de hG-CSFR; para su crecimiento *in vitro* requieren IL-3 o hGH. Tras su unión al receptor y en ausencia de hormona o citocinas, el GHR05 desencadena una señal que conduce a la expresión de bcl-2 y el crecimiento celular en células Ba/F3 (8/6). Ambos, el GHR05 y la hGH, inducen la proliferación de las células IM-9 y activan la vía de JAK/STAT. Se ha propuesto un modelo en el que la primera etapa en la proliferación celular mediada por GH está asociada con un cambio conformacional en la estructura del receptor de la hormona de crecimiento.

Figuras

Figura 1. Características principales del AcMo GHR05.

Figura 2. Unión de GHR05 a diferentes líneas celulares que expresan hGHR.

Figura 3. Efecto de la hGH, el hGHG120R o la permeabilización sobre la unión del AcMo antiGHR a Ba/F3 (8/6).

Figura 4. Efecto de la hGH y el GHR05 sobre la distribución del ciclo celular de las células Ba/F3 (8/6).

Figura 5. Expresión de los genes implicados en la supervivencia o muerte celular en las células Ba/F3 (8/6) tratadas con hGH o GHR05.

Figura 6. Efecto del AcMo GHR05 sobre la proliferación de las células Ba/F3 (8/6) e IM-9.

Figura 7. Activación de JAK2 y STAT5 sobre las células IM-9 tratadas con hGH o GHR05.

Procedimientos experimentales

Proteínas, anticuerpos y líneas celulares. La GH recombinante humana de 22 K (rhGH-22K, Genotropin) y la GHBP recombinante humana se obtuvieron de Pharmacia & Upjohn (Estocolmo, Suecia). El Dr. Gunnar Norstedt amablemente donó el hGHG120R (Centro de Biotecnología, Karolinska Inst., Huddinge, Suecia). Las células IM-9 procedían del ATCC (Rockville, MD). Las células Ba/F3 (8/6) se generaron mediante transfección de células Ba/F3 con el constructo quimérico hGHR/hG-CSFR y se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con IL-3 (10 U/ml) y 10% de suero bovino fetal (SBF) a 37°C en CO₂ al 5%. El AcMo JAK2 antihumano procedía de Upstate Biotechnology, Inc. (UBI, Lake Placid, NY), los AcMo STAT5 antihumano, c-myc antimurino y bax antimurino procedían de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA), el AcMo bcl-2 antimurino procedía de Oncogene Science Inc. (Cambridge, MA) y el AcMo p53 antimurino se obtuvo de Transduction Laboratories (Lexington, KY).

Preparación de anticuerpos monoclonales. Ratones BALB/c se inmunizaron por vía subcutánea (s.c.) con 10 µg de GHBP en 0,1 ml de suero salino tamponado con fosfato (PBS) estéril y adyuvante completo de Freund (Difco, Detroit, MI). Se inyectó por vía subcutánea los días 30 y 60 con 10 µg de proteína en adyuvante incompleto de Freund y por vía intraperitoneal en PBS el día 90. Los días -3 y -2 antes de la fusión celular se inocularon a los ratones por vía intravenosa 10 µg de proteína en PBS. Se fusionaron células de bazo de ratón y/o de ganglio linfático con la línea celular de mieloma P3X63-Ag8.653 (CRL 1580, American Type Culture Collection, Rockville, MD) usando polietilenglicol 4000 (Merck, Darmstadt, Alemania) siguiendo protocolos estándar (23, 24). Los sobrenadantes se sometieron a pruebas para detectar anticuerpos usando un inmunoensayo ligado a enzimas (EIA) y se clonaron hibridomas positivos. Los hibridomas se cultivaron en medio RPMI 1640, 10% de SBF a 37°C en CO₂ al 5%. Los anticuerpos monoclonales se produjeron en sobrenadantes de cultivo tisular y líquido ascítico murino (25) y se purificaron mediante precipita-

ción $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (24). Los isotipos de los anticuerpos se determinaron mediante EIA usando antisuero específico de subclase marcado con peroxidasa (PO) (ICN, Irvine, CA).

Biotinilación de proteínas. La biotinilación de proteínas se llevó a cabo como se describe (26). Se incubó GHBP y AcMo (0,5 mg en 0,5 ml de NaCl 150 mM, tampón carbonato 0,1M, pH 9) con 50 μl de biotín N-hidroxisuccinimida a 1 mg/ml en dimetilsulfóxido (Sigma, San Louis, MO) durante 120 minutos a temperatura ambiente. Mediante diálisis contra PBS se eliminó la biotina libre. La proteína marcada con biotina se diluyó a una proporción de 1:22 con glicerol y se almacenó a -20°C .

Inmunoensayos ligados a enzimas. Se llevaron a cabo cuatro inmunoensayos ligados a enzimas (EIA) distintos que variaban en su mecanismo de presentación del antígeno al anticuerpo.

1. *Ensayo de captación de anticuerpos.* La GHBP marcada con biotina (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS, 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$) se adsorbió a placas de microtitulación recubiertas con avidina (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Maxi-sorb, Nunc, Copenhagen, Dinamarca) durante 90 minutos a 37°C . Los sitios restantes de unión a proteína se bloquearon con BSA al 0,5% en PBS. Las placas se lavaron con agua destilada y el AcMo se incubó durante 60 minutos a 37°C , seguido por un anticuerpo inmunoglobulina anti-ratón de cabra marcado con PO (GAM-PO; Tago, Burlingame, CA) y diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD, 4 mg/ml en tampón citrato sódico 0,15M, pH 5,0; Sigma). La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 3N y la densidad óptica se determinó a 492 nm.

2. *Ensayo de captación de antígenos.* Los anticuerpos monoclonales se adsorbieron a la fase sólida, directamente (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS) o a través de un anticuerpo GAM purificado por afinidad. Después de bloquear, se incubó GHBP marcada con biotina (1/1000) en PBS-0,5% de BSA durante 60 minutos a 37°C , seguido por estreptavidina marcada con PO (Sigma) durante 30 minutos a 37°C , y OPD. La reacción se detuvo como antes.

3. *Ensayo de captación de tipo sandwich.* El AcMo purificado (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS) se adsorbió a placas de microtitulación. Después de incubación durante la noche a 4°C y bloquear con BSA al 0,5%, se añadieron diluciones de GHBP en PBS-BSA al 0,5% y se incubó durante 60 minutos a 37°C . Después de lavar se añadió un segundo AcMo marcado con biotina, seguido por estreptavidina-PO y OPD. La reacción se detuvo como antes.

4. *Ensayo competitivo.* La GHBP (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS) se adsorbió a placas de microtitulación durante la noche a 4°C , después se bloqueó con PBS-BSA al 0,5% durante 60 minutos a 37°C . Las placas se lavaron y se añadió el AcMo biotinilado, solo o mezclado con anticuerpos competidores, y se incubó durante 90 minutos a 37°C , seguido por estreptavidina-PO. La reacción se detuvo como antes. Se supuso la competición por la unión a GHBP cuando se observó una disminución de la señal de más del 40% en presencia del anticuerpo añadido en comparación con la que se produjo con GHR05 solo; es decir, los dos AcMo reconocían epítomos similares o proximales en la molécula de GHBP.

Determinación de los parámetros cinéticos usando análisis de la interacción a tiempo real. Para determinar los parámetros cinéticos de la unión de AcMo a la GHBP y al complejo hGH-hGHBP se usó BIAcore®, un análisis de interacción a tiempo real (Pharmacia, Uppsala, Suecia). La matriz de dextrano carboxilado CM-5 de una placa sensora se activó con una mezcla de EDC/NHS (N-etil-N'-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimidaclorhidrato/N-hidroxisuccinimida) (Pharmacia). A continuación se inmovilizó la cadena ligera de la inmunoglobulina anti-ratón de conejo (35 μl a 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$, Pharmacia) solubilizada en tampón acetato 10 mM, a pH 4,5, en la matriz a través de grupos amina primarias en Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM, tensorioactivo P20 al 0,05%, pH 7,4 (HBS) a una velocidad de flujo de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Los grupos sin reaccionar se bloquearon con 35 μl de etanolamina-HCl, pH 8,5. Las determinaciones se realizaron a 25°C usando ocho concentraciones de GHBP (4-500 nM), sola o en complejo con un exceso molar de hGH 20 veces mayor. Se inyectó GHBP o GH/GHBP en HBS a una velocidad de flujo constante de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ sobre el AcMo GHR05, previamente captado por las cadenas ligeras anti-ratón de conejo inmovilizadas con dextrano. Después de cada determinación, la superficie se regeneró durante 3 minutos con HCl 30 mM. Las constantes cinéticas de la velocidad (Kon y Koff) y las aparentes constantes de afinidad en equilibrio ($K_a = \text{Kon}/\text{Koff}$) se determinaron usando el software de evaluación cinética BIAlogue® (Pharmacia).

Análisis citofluorométrico. Las células ($2 \times 10^5/100 \mu\text{l}$) se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo en V y se incubaron con 100 μl de etanol al 70% durante 10 minutos a 4°C para permeabilizar, o en PBS con BSA al 2% y 2% de SBF (PBSst). Después de lavar con PBSst, las células se incubaron con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de hGH o PBSst durante 30 minutos a 4°C , se lavaron dos veces y se incubaron con 100 μl de sobrenadantes sin diluir durante 30 minutos a 4°C . Las células se lavaron dos veces con PBSst, se añadió GAM marcado con fluoresceína isotiocianato (GAM-FITC, Southern Biotechnologies, Birmingham, AL) y se incubaron durante 30 minutos a 4°C . Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo EPICS XL (Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL).

Análisis de inmunoprecipitación, SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western. Las células tratadas con hormonas o anticuerpos (2×10^6) se lisaron en Tris-HCl 50 mM a pH 7,6, 1% de Nonidet P40®, NaCl 250 mM, EDTA 0,5 mM, NaF 10 mM, pirofosfato sódico 10mM con inhibidores de proteasa durante 20 minutos a 4°C , y se centrifugaron a 15.000 x g. Los extractos proteicos se separaron mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida) dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) al 12,5% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Para los análisis de inmunotransferencia de tipo Western, las membranas se bloquearon con 5% de leche seca desgrasada (singrasa) en Tris-HCl 20 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM (TBS) y se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpo primario en 5% de leche seca

desgrasada-TBS. Las membranas se lavaron con Tween 20[®] al 0,1% en TBS-leche seca desgrasada y se incubaron con el segundo anticuerpo marcado con PO. Después de lavar, se desarrollaron las proteínas usando el sistema ECL (Amersham, Little Chalfont, RU). Cuando se requirió la recuperación, las membranas se incubaron con Tris-HCl 62,5 mM a pH 6,8, SDS al 2%, 2-mercaptoetanol 0,1M durante 90 minutos a 60°C y se lavaron extensamente con TBS antes de volver a bloquear y de usar la sonda.

La inmunoprecipitación se llevó a cabo como se describe (27). Brevemente, los extractos proteicos se aclararon previamente mediante incubación con 20 μg de IgG anti-ratón-agarosa (Sigma) durante 60 minutos a 4°C y centrifugación durante 1 minuto a 15.000 x g. Las proteínas que contenían fosfotirosina se inmunoprecipitaron con AcMo antifosfotirosina (5 μg /muestra) (Transduction Laboratories) durante 90 minutos a 4°C, seguido por IgG anti-ratón-agarosa. Las muestras se centrifugaron, los precipitados de agarosa se lavaron dos veces en tampón detergente y tres veces en Tris-HCl 50 mM a pH 7,6, se resuspendieron en tampón Laemmli y las proteínas se resolvieron mediante electroforesis.

Ensayo de proliferación celular. Células Ba/F3 (8/6) (20 x 10⁵/ml) se lavaron con medio RPMI 1640 basal sin IL-3. Después se añadieron 25 μl de la suspensión celular a placas de 96 pocillos y se trataron con hGH (0,001 mM-10 mM) o AcMo en un volumen final de 100 μl durante 18 horas a 37°C. Las células IM-9 confluentes (1 x 10⁶/ml) se lavaron en medio RPM 1640 sin suero y 100 μl de la suspensión celular se incubaron en placas de 96 pocillos en presencia de hGH o AcMo durante 8 horas a 37°C. Para medir la síntesis de ADN, se añadió 1 μCi /pocillo de timidina [³H] (Amersham) (5 Ci/mmol), se incubó durante 6 horas a 37°C en CO₂ al 5%. Se recogieron las células, se lavaron en filtros de fibra de vidrio y se cuantificó la captación de timidina [³H] mediante contaje de centelleo líquido.

Análisis del ciclo celular. La etapa del ciclo celular se valoró mediante el contenido de ADN de la células usando marcaje con yoduro de propidio y análisis de citometría de flujo. Brevemente, las células subconfluentes se lavaron tres veces en medio RPMI-SBF al 10% sin IL-3 (medio basal), se sembraron en placas a 3 x 10⁵ células/pocillo en placas de 24 pocillos (Nunc[®]) y se trataron con hGH (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o AcMo (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), hasta llegar a un volumen final de 1 ml. Después de una incubación de 24 horas a 37°C en CO₂ al 5%, las células se centrifugaron 10 minutos a 200 x g y se resuspendieron en 100 μl de PBS. Las células se permeabilizaron y se marcó el ADN mediante la adición de 100 μl de detergente seguido por una solución de 1,2 ml de yoduro de propidio (reactivos de Coulter DNA-Prep[®]). Después de agitar en un vórtex, las muestras se incubaron a 37°C durante 30 minutos y se analizaron en un citómetro EPICS-XL[®] (Coulter).

Resultados

Caracterización del anticuerpo anti receptor de la hormona de crecimiento. Mediante el uso de hGHBP recombinante derivada de *E. coli* como inmunógeno, hemos generado una serie de AcMo, uno de los cuales (GHR05) se caracterizó más adelante. El GHR05 es una IgM, anticuerpo k específico del receptor de la hGH, con una K_a de 2,5 ó 6 x 10⁶ M⁻¹según se ha medido en BIAcore[®] usando GHBH o complejo GH/GHBP, respectivamente. El BIAcore[®] mide las interacciones a tiempo real y, por tanto, determina la asociación entre GHR05 y GHBP o GH/GHBP sin que se observen diferencias apreciables (1,7 x 10³ y 3,2 x 10³ M⁻¹ s⁻¹, respectivamente) (figuras 1A, B). Sin embargo, el GHR05 se disocia menos rápido de la GHBP (2,6 x 10⁻⁴s⁻¹) de lo que lo hace del complejo GH/GHBP (1,2 x 10⁻³ s⁻¹). Por tanto, este anticuerpo se une a GHBP y al complejo con una K_{on} similar, aunque los datos de disociación indican que el complejo GHR05/GHBP es más estable que el formado por GHR05/GH/GHBP.

Dado que una característica de los receptores de citocinas es su fuerte glucosilación y el uso último de GHR05 era el estudio del GHR, hemos probado su reconocimiento en GHBP derivado de CHO. En ensayos EIA de captación de antígenos, GHR05 reconoce la GHBP, esté o no glucosilada (figura 1C). El reconocimiento también fue evidente en los ensayos EIA de captación de anticuerpos, transferencia western, inmunoprecipitación e interacciones específicas a tiempo real usando GHR05 acoplado a una matriz de dextrano o en fase líquida (no se muestra).

Para determinar la región del hGHR reconocida por GHR05, se diseñaron tres ensayos diferentes en función de la capacidad de este AcMo para unirse de forma simultánea o competir por la unión de GHBP con otros AcMo antiGHR que reconocen epítomos secuenciales o conformacionales. Estos ensayos incluyen un EIA de tipo sándwich, un EIA competitivo y un ensayo de adición en BIAcore[®]. Los datos proporcionan información acerca de los AcMo que se unen de forma simultánea a una única molécula de GHBP, los que se unen a epítomos superpuestos o idénticos y, usando hGH, aquellos con interacciones que interfieren o que no interfieren con el sitio de unión al ligando. Con estos ensayos, se determinó que el epítomo reconocido por GHR05 residía en la zona articulada entre los subdominios I y II del dominio extracelular del receptor. Este epítomo no forma parte del sitio de unión a hGH.

Hemos valorado la reactividad de GHR05 con el hGHR expresado en la superficie de dos líneas celulares diferentes. Hemos probado la IM-9, una línea de células B humanas que expresa un hGHR funcional (28) según muestra su capacidad para responder a hGH intensificando la proliferación celular (29), la producción de IgG (30) y el influjo de [Ca²⁺]_i (31). También hemos usado la línea de células B murinas dependiente de IL-3 Ba/F3 (22) que han sufrido una transfección con un gen químérico que contiene el dominio extracitoplásmico del hGHR y el dominio intracitoplásmico del receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos humanos (Ba/F3 (8/6)). Aunque tanto las células de tipo salvaje como las que se han sometido a transfección crecen en presencia de IL-3 exógena, sólo las células sometidas a transfección proliferan en presencia de hGH (32), GHR05 reconoce hGHR en ambas líneas celulares, IM-9 y Ba/F3 (8/6), ya que se observó un desplazamiento significativo de la fluorescencia (15%) en la citometría de flujo,

mientras que no se observó unión en las células Ba/F3 sin transfeccionar (figura 2).

5 *El anticuerpo GHR05 reconoce un epítipo de activación en el receptor de la hormona de crecimiento.* Parece que la dimerización del hGHR es esencial para una correcta transmisión de la señal. Para evaluar la capacidad del GHR05 para reconocer el complejo dimérico hGH-(hGHR)₂, se estudió la unión de varios AcMo a las células Ba/F3 (8/6) previamente tratadas con concentraciones de hGH saturantes ($0,45 \times 10^{-6}$ M). La unión de GHR05 al receptor en forma de complejo aumenta, mientras que la unión de otro AcMo no se ve afectada (AcMo 263) o disminuida (GHR25) (figuras 3A, B, C). Parece que estos fenómenos no se deben a la estabilización de la unión de los AcMo al complejo hGH/hGHR, al menos en términos de afinidad, ya que las mediciones den BIAcore[®] muestran que el GHR05 tiene una K_a aparente similar para tanto la hGHBP como para el complejo hGH/hGHBP (figuras 1A, B).

15 La unión de GHR05 al hGHR aumenta de forma espectacular cuando las células se han permeabilizado previamente (Figura 3E). Este fenómeno es específico de GHR05, ya que este AcMo se une al 100% de las células tras la permeabilización, que no es el caso para el AcMo específico para otros dominios del hGHR (figura 3F). Este aumento no se puede atribuir a la internalización del complejo hGH/hGHR, ya que el experimento se realizó en ausencia de hGHm ni al patrón de glucosilación del receptor, ya que la glucosilación no alteró el reconocimiento del GHR05 (figura 1C). Por tanto, el incremento de la unión puede deberse a una exposición mejorada del epítipo de unión de GHR05.

20 Para analizar la posible relación entre el incremento de la unión de GHR95 y el cambio conformacional del receptor inducido por hGH, se empleó un mutante de hGH (hGHG120R) que es capaz de unirse al hGHR pero no de formar el complejo hGH-(hGHR)₂ activo. El hGHG120R tiene una mutación Gly120> Arg que afecta al segundo sitio de unión de la GH, lo que impide la correcta dimerización del receptor y la posterior inducción de la proliferación (33). Se ha mostrado que esta molécula actúa como antagonista del GH tanto *in vitro* (13, 16, 34) como *in vivo* (34). A diferencia de la hGH, la presencia de hGHG120R no modifica la unión de GHR05 al receptor (figura 3D), lo que nos ha permitido concluir que GHR05 reconoce mejor un epítipo que se ve expuesto en el complejo activo del receptor, pero no en el inactivo.

30 *GHR05 señala a través del hGHR e induce la proliferación celular.* Como se ha mostrado anteriormente, el GHR05 se une a las células que expresan hGHR en ausencia de ligando. Para estudiar la significación biológica de esta unión hemos estudiado el estado del ciclo celular en células Ba/F3 (8/6) dependientes de hGH tratadas con hGH, GHR05 o GHR19, un AcMo específico de hGHR y de igual isotipo. Después de 24 horas, se analizó la distribución del ciclo celular mediante citometría de flujo. Las células tratadas con hGH crecían de forma subconfluyente, mientras que las células tratadas con GHR19 mostraban un incremento marcado de la subpoblación en la fase sub-G₁, indicativo de apoptosis. Sin embargo, cuando las células se trataron con GHR05, la proporción de apoptosis fue significativamente inferior a la de las células tratadas con GHR19, mientras que la proporción de células en proliferación aumentó (figura 4). Esto indica que la unión de GHR05 induce una señal del tipo de la de GH.

40 El efecto de supervivencia celular desencadenado por GHR05 se caracterizó más adelante mediante el estudio de la expresión de las proteínas de control de la supervivencia celular bcl-2 (35), bax, p53, así como de c-myc, cuya expresión desregulada conduce a ciertas células a la apoptosis después de que se ven privadas del factor de crecimiento. El tratamiento con hGH o GHR05 de las células produce la expresión de bcl-2 mientras se impide la inducción de bax, p53 y c-myc, que se expresan tras el tratamiento con oros AcMo antiGHR (figura 5).

45 Para valorar más el efecto proliferativo inducido por la unión de GHR05, medimos la incorporación de timidina [³H] inducida por hGH y GHR05 a las células Ba/F3 (8/6). El GHR05 induce una proliferación celular significativamente mayor (25%) que un AcMo control (8%, equivalente a la anterior) (figura 6A). El máximo nivel de incorporación de timidina [³H] inducido por GHR05 es equivalente al estimulado por hGH 4 pM. Por tanto, la unión de GHR05 al GHR estimula señales específicas responsables de la inducción del crecimiento celular. Dado que el epítipo reconocido por GHR05 se modifica cuando la hGH se une al receptor, hemos probado si la unión del anticuerpo en presencia de hGH tiene un efecto sinérgico o aditivo sobre la proliferación celular. No se observaron diferencias en la proliferación cuando las células se incubaron de forma simultánea con GHR05 y hGH (datos no mostrados).

55 Dado que las células Ba/F3 (8/6) son células respondedoras a GH que se han generado de forma artificial, los resultados se validaron usando la línea celular humana IM-9, que expresa el hGHR de longitud total. Tanto GHR05 como hGH estimulan la proliferación de células IM-9 (figura 6B). Para verificar la especificidad de la señalización de GHR05, las células IM-9 se trataron con hGH y GHR05 y se determinó el estado de fosforilación de la tirosina de JAK2 y STAT5. En ambos tratamientos se observó el mismo patrón de expresión de JAK2 y STAT5, lo que indica un comportamiento agonista de GHR05 (figura 7). Por tanto, hemos concluido que GHR05 desencadena la activación y proliferación celular de tipo GH tras la unión a hGHR.

60 *Análisis*

Usando rhGHBP derivada de *E. coli* como inmunógeno, hemos obtenido el AcMo específico de hGHR GHR05. La caracterización exacta de su reactividad mediante el uso de la región extracelular soluble del receptor (GHBP) y la unión competitiva con otros AcMo antiGHR permite establecer el mapa del epítipo reconocido por este AcMo en la región articulada entre los subdominios de GHR I (dominio de unión) y II (dominio de dimerización). Este epítipo no está relacionado con las secuencias implicadas en la unión de GH al receptor (15). Estos datos se correlacionan bien

con el hecho de que este AcMo reconoce tanto GHBP como GHR formando complejo con GH. Sin embargo, se han puesto de manifiesto algunas diferencias interesantes cuando se compara el comportamiento del AcMo con GH/GHBP o con los complejos GH/GHR.

5 La unión de GHR05 al hGHR de la membrana celular aumenta tras la activación de hGH, según se ha determinado mediante análisis de citometría de flujo con células que expresan el hGHR nativo o una forma hGHR7hG-CSFR quimérica. Su afinidad por la forma soluble del receptor, GHBP, es similar al la que tiene por el complejo GH/GHBP, lo que indica que el epítipo reconocido por GHR05 no se altera por la unión de GH en condiciones saturantes. Cuando se analizan las constantes de asociación y de disociación, la unión de GHR05 al complejo GH/GHBP parece menos estable que su unión a la GHBP sola. En cada uno de estos ensayos las características son diferentes, ya que el flujo continuo en el BIAcore® permite la medición de la asociación y la disociación a una única molécula de GHBP, mientras que la medición de la unión a células intactas en la citometría de flujo permite el equilibrio con varias moléculas de GHR. Sin embargo, los datos sugieren que la conformación del dominio extracelular de GHR varía considerablemente en función de si está en fase líquida (GHBP) o unido a la membrana (hGHR nativo o hGHR/hG-CSFR quimérico).
10 Por consiguiente, los modelos que usan GHBP para caracterizar las interacciones GH/GHR deben interpretarse con precaución.

Para determinar si estos cambios conformacionales del receptor inducidos por la unión de GH están relacionados con la señalización, estudiamos si hGHG120R induce o no cambios similares. Dado que este mutante carece de sitio de unión 2 para hGH, no puede inducir la dimerización funcional del receptor y, por tanto, actúa como antagonista de hGH (13, 16, 34). Como también se ha descrito para células FDC-P1 sometidas a transfección con un híbrido del dominio extracelular de hGHR unido a los dominios intracelular y transmembrana del GM-CSFR murino (16), no puede inducir la proliferación de las células Ba/F3 (8/6) o IM-9 (34, 36). Esto se atribuyó en un principio a la ausencia de la formación del complejo hGH-(hGHR)₂ “activo”, pero datos recientes muestran que hGHG120R dimeriza e internaliza el GHR como lo hace la GH (37). La unión de GHR05 no aumenta en las células Ba/F3 (8/6) incubadas con hGHG120R, al contrario de su comportamiento con hGH nativa. Por tanto, la mayor cantidad de unión de este AcMo se debe a la exposición del epítipo del receptor tras la dimerización con hGH y GHR05 sí reconoce una conformación activa de GHR necesaria para la transducción de señal en respuesta a la hormona de crecimiento. Por tanto, la conformación de hGHR difiere dependiendo de si está en forma de complejo con hGH o con hGHG120R, y su alteración es suficiente como para justificar las diferencias de señalización observadas entre estos dos ligandos. Se ha probado que GHR05 es un instrumento extremadamente útil para la discriminación y caracterización de la forma activada del receptor.
20
25
30

Dado que GHR05 reconoce la conformación activa de hGHR y el epítipo reconocido es sensible a la conformación e importante para la transducción de la señal, hemos probado si GHR05 actúa sobre la señalización a través del receptor en ausencia de hGH. Hemos usado una línea celular dependiente de hGH sometida a transfección que prolifera en presencia de hGH o cuando se trata con GHR05. La proporción de proliferación inducida por GHR05 se correlaciona con la proporción de células que expresan el epítipo activo reconocido por el anticuerpo. La unión de hGH y GHR05 con el hGHR se correlaciona con la expresión de genes que controlan la supervivencia celular y el ciclo celular, ya que ambos tratamientos inducen señales que conducen a la expresión de bcl-2, una proteína implicada en el rescate de la apoptosis. Además, bax, p53 y c-myc, expresados durante la apoptosis, se detectan cuando las células se tratan con el AcMo irrelevante, pero no en presencia de hGH o GHR05. Por tanto, el crecimiento celular estimulado por GHR05 es un proceso específico desencadenado por la unión específica de este AcMo a la zona articulada entre los dominios I y II del hGHR, que no es el caso del AcMo que se une a otros epítopos de hGHR.
35
40
45

Aunque son dependientes de hGH, las células Ba/F3 (8/6) expresan un receptor de hGH quimérico cuyo dominio intracelular corresponde al del receptor de hG-CSF. GHR05 también induce crecimiento cuando se usan células que expresan el hGHR de longitud total, tal como células IM-9. El crecimiento de las células IM-9 es independiente de hGH, aunque responde a hGH mediante fosforilación de la tirosina de JAK2 (36), producción de inmunoglobulina y proliferación en ciertas condiciones experimentales (30). GHR05 también genera señales específicas para GH en las células IM-9, ya que simula la activación inducida por hGH de la vía de JAK/STAT.
50

Nuestros resultados son compatibles con un modelo en el que el hGHR se transporta a la membrana como una única cadena que, tras su expresión en la superficie de la célula, se agrega o asocia con otras proteínas. En tal complejo se dificulta el reconocimiento de GHR05 de la secuencia de aminoácidos de la región articulada entre los dominios I y II. Después de la unión a hGH, el hGHR sufre una transición a una etapa activa; esta etapa se distingue por una conformación modificada que el anticuerpo reconoce. Esta conformación activa desencadena una vía de transducción que implica la fosforilación de motivos de tirosina específicos en el dominio citoplásmico de hGHR, así como la inducción de factores de transcripción específicos que conducen a la proliferación celular. En cada célula, una fracción de células o una fracción del hGHR está en la conformación activa y. Por tanto, sujeta al reconocimiento por el anticuerpo. Estos cambios diferenciales de conformación o de la accesibilidad del dominio pueden ser importantes en el reconocimiento físico y la asociación del dominio intracitoplásmico del hGHR con las JAK tirosina quinasas o en su interacción con los STAT adecuados. La caracterización de este estado “activo” podría así ser importante para una comprensión más clara de las vías de señalización desencadenadas por la hormona de crecimiento.
55
60
65

Leyendas de las figuras

Figura 1

5 *Características principales del AcMo GHR05*

A, Superposición de seis sensorigramas que muestran la unión de hGHBP por GHR05. Las concentraciones de hGHBP (que varían de 4-500 nM) en un volumen de 30 μ l se pasaron secuencialmente sobre la célula de flujo y en el sensorigrama la asociación se controló como unidades de resonancia (UR). Después de la inyección de hGHBP, se continuó con el flujo del tampón y se midió la disociación. El histograma representa en tiempo del ensayo en segundos (eje x) frente a la respuesta relativa en UR (eje y). Las flechas indican la inyección del AcMo GHR05 (1), hGHBP (2) y tampón (3). Sustituyendo el complejo hGH/hGHBP por hGHBP se obtuvo una figura similar. B, valores de la concentración de hGHBP o del complejo hGH-hGHBP (eje x) frente al valor de la constante de disociación (k_s) para cada condición (eje y). La pendiente de regresión corresponde a la constante de disociación verdadera; se llevó a cabo un cálculo similar para la constante de disociación. C, reconocimiento de hGHBP glucosilado o no glucosilado por parte de GHR05 en un EIA de tipo sándwich usando AcMo 263 como anticuerpo de captación. El gráfico representa la fuente de hGHBP (eje x) frente a la $DO_{492\text{ nm}}$ obtenida por GHR05 como un porcentaje de la señal máxima (eje y). Los datos representan las medias de determinaciones por triplicado, con la DE indicada.

20 Figura 2

Unión de GHR05 a diferentes líneas celulares que expresan hGHR

Se marcaron células Ba/F3, Ba/F3 (8/6) e IM-9 en crecimiento exponencial con GHR05. Los histogramas muestran el marcaje con GHR05 (eje x, línea continua) frente al número de células (eje y), en comparación con un AcMo irrelevante de igual isotipo (línea discontinua).

Figura 3

30 *Efecto de hGH, hGHG120R o permeabilización sobre la unión del AcMo antiGHR a las células Ba/F3 (8/6)*

Las células Ba/F3 (8/6) en crecimiento exponencial se marcaron con GHR05 (A, D y E), GHR25 (B y F) o AcMo 263[®]. Las gráficas superiores muestran el efecto de la incubación previa con hGH (10 μ g/ml) (-----) sobre la unión del AcMo (A, B y C). La gráfica D muestra el efecto de la incubación previa con hGHG120R (- - - -) o hGH (-----) sobre la unión de GHR05. Las gráficas E y F muestran el efecto de la permeabilización con etanol (-----) sobre la unión del AcMo antiGHR en comparación con la de las células intactas (_____). Los histogramas muestran el marcaje con AcMo antiGHR (eje x) frente al número de células (eje y). En cada gráfica, las líneas discontinuas representan el marcaje de un AcMo irrelevante de igual isotipo.

40 Figura 4

Efecto de la hGH y el GHR05 sobre la distribución del ciclo celular de las células Ba/F3 (8/6)

Las células Ba/F3 (8/6) se expusieron a los estímulos indicados durante 24 horas en medio basal sin hGH o IL-3 y se determinó la distribución del ciclo celular mediante marcaje con yoduro de propidio y citofluorometría de flujo. Se cultivaron células quiescentes en condiciones de crecimiento exponencial en 10 μ g/ml de hGH, 1 μ g/ml de GHR05 o 1 μ g/ml del AcMo control de igual isotipo GHR19. Los histogramas muestran el contenido relativo en ADN (eje x) frente al número de células (eje y). Los recuadros indican el porcentaje de células que se encuentra en cada fase del ciclo celular.

50 Figura 5

Expresión de genes implicados en la supervivencia o muerte celular en células Ba/F3 (8/6) tratadas con hGH o con GHR05

Células Ba/F3(8/6) privadas de citocinas se incubaron durante 20 horas a 37°C con hGH (10 μ g/ml, carril 1), GHR05 (1 μ g/ml, carril 2) o GHR19 (AcMo control de igual isotipo, 1 μ g/ml, carril 3). La figura muestra los lisados totales de 10×10^6 sometidas a electroforesis, transferidas y sometidas a inmunotransferencia con A, AcMo bcl-2 anti-ratón, B, AcMo p53 anti-ratón, C, AcMo c-myc anti-ratón y D, AcMo bax anti-ratón.

60 Figura 6

Efecto del AcMo GHR05 sobre la proliferación de células Ba/F3 (8/6) e IM-9 Gráfica superior

La proliferación de células Ba/F3 (8/6) en presencia de hGH (500 nM) o GHR05 (1 μ g/ml) se determinó mediante la incorporación de timidina [³H] en el ADN. Las células cultivadas en ausencia de citocinas se incubaron durante 20 horas a 37°C en placas de 96 pocillos de fondo plano con hG11, GHR05 o GHR25 como control. La timidina [³H] se añadió durante 6 horas y las células se recogieron en filtros de fibra de vidrio. Gráfica inferior, la

ES 2 224 367 T3

proliferación de células IM-9 en presencia de hGH (500 nM) o GHR05 (100 ng/ml) se determinó después de 8 horas a 37°C mediante la incorporación de timidina [³H] como antes. Se presentan los resultados de los tres experimentos realizados por cuadruplicado y se indican las DE. Los histogramas muestran el tratamiento de las células (eje x) frente a la incorporación de timidina [³H] en cpm (eje y).

5
Figura 7

Activación de JAK2 y STAT5 en células IM-9 tratadas con hGH o GHR05

10 Durante 5 minutos a 37°C se incubaron células IM-9 privadas de suero con hGH (500 nM, gráfica superior) o GHR05 (100 ng/ml, gráfica inferior). La figura muestra los inmunoprecipitados de fosfotirosina de 10 x 10⁶ células (+, células tratadas durante 5 minutos; - células sin tratar), inmunotransferencia con AcMo JAK2 antihumano (izquierda) o AcMo STAT5 (derecha).

15 Bibliografía

1. Milman A.E. y Russell J.A. (1950) *Endocrinology* 47, 114-119
2. Swislocki N. L., Sonenberg M. y Yamasaki X (1970) *Endocrinology* 87, 900-904
3. Morikawa M., Nixon T. y Green H. (1982) *Cell* 29, 783-789
4. Okada S., Chen W. Y., Wiehl P., Kelder B., Goodman H. M., Guller S., Sonenberg M. y Kopchick J. J. (1992) *Endocrinology* 130, 2284-2290
5. Cosman D., Lyman S. D., Idzerda R. L., Beckmann M. P., Park S. L., Goodwin R. G. y March C. J. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 265-270
6. Kelly P. A., Djiane J., Postel-Vinay M. y Edery M. (1991) *Endocrine reviews* 12, 235-251
7. Bazan J. F. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 788-795
8. Thoreau E., Petridou B., Kelly P. A., Djiane J. y Mornon J. P. (1991) *FEBS Lett.* 282, 26-31
9. Miyajima A., Kitamura T., Harada N., Yokota T., y Arai K. (1992) *Annu. Rev. Immunol.* 10, 295-331
10. Kitamura T., Ogorochi T y Miyajima A (1994) *Trends Endocrinol. Metab.* 5, 8-14
11. Leung DW, Spencer S. A., Cachianes G., Hammonds R. G., Collins C., Henzel W. J., Barnard R., Waters M. J. y Wood W. I. (1987) *Nature* 330, 537-543
12. Spencer S. A., Hammonds R. G., Henzel W. J., Rodríguez H., Waters M. J. y Wood W. I. (1988) *J. Biol. Chem* 262, 7862-7867
13. Fuh G., Mulkerrin M. G., Bass S., McFarland N., Brochier M., Bourell, J. H., Light D. R. y Wells J. A. (1989) *J. Biol. Chem.* 265, 3111-3115
14. Wells J. A. Binding in the growth hormone receptor complex (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 3, 1-6
15. De Vos A. M., Ultsch M. y Kossiakoff A. A. (1992) *Science* 255, 306-312
16. Fuh G., Cunningham B. C., Fukunaga R., Nagata S., Goeddel D. V. y Wells J. A. (1991) *Science* 256, 1677-1680
17. Argetsinger, L. S., Campbell G. S., Yang X., Withuhn B. A., Silvennoinen O., Ihle J. N. y Carter-Su C. (1993) *Cell* 74, 237-244
18. Meyer D. J., Campbell G. S., Cochran B. H., Argetsinger L. S., Larner A. C., Finbloom D. S., Carter-Su C. y Schwartz J. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 4701-4704
19. Gronowski A. M. y Rotwein P. (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 7874-7878
20. Hansen L. H., Wang X., Kopchick J. J., Bouchelouche P., Nielsen J. H., Galsgaard E. D. y Billestrup N. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 12669-12673
21. Xu B. C., Wang X., Darus C. J. y Kopchick J. J. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 19768-19773
22. Palacios R. y Steinmetz M. (1985) *Cell* 41, 727-734

ES 2 224 367 T3

23. **Galfre G., Howe S. C., Milstein C., Butcher G. W. y Howard J. C.** (1977) *Nature* **266**, 550-552
24. **Harlow E. y Lane D.**, eds (1988) *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, NY
25. **Hoogenraad N. J. y Wraight C. J.** (1986) *Methods Enzymol* **121**, 375-381
26. **Fraker P. J. y Speck J. C.** (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 849-857
27. **Carrera A. C., Borlado L. R., Martínez A. C. y Mérida I.** (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 19435-19440
28. **Lesniak M. A., Gorden P., Roth J. y Gavin J. R. III** (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 1661-1667
29. **Suzuki K., Suzuki S., Saito Y., Ikebuchi H. Y Terao T.** (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 11320-11327
30. **Yoshida A., Ishioka C., Kimata H. y Mikawa H.** (1992) *Acta Endocrinol* **126**, 524-529
31. **Iondo M. M., De Meyts P. y Bouchelouche P.** (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 391-397
32. **Mellado M., Rodríguez-Frade J. M., Kremer L. y Martínez A. C.** (1996) *J. Clin. Endocrinol Metab.* **81**, 1613-1618
33. **Rowlison S. W., Barnard R., Bastiras S., Robins A. J., Brinkworth R. y Waters M. J.** (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 16833-16839
34. **Chen W. Y., Chen N., Yun J., Wagner T. E. y Kopchick J. J.** (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 15892-15897
35. **Genaro A. M., Gonzalo J. A., Boscá L. y Martínez A. C.** (1994) *Eur. J. Immunol.* **24**, 2515-2521
36. **Silva C. M., Lu H., Weber M. J. y Thorner M. O.** (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 27532-27539
37. **Harding P. A., Xinzhong W., Okada S., Chen W. J., Wan W. y Kopchick J. J.** (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 6708-6712

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para determinar la activación del receptor de la hormona de crecimiento humana (hGHR), me-
diante el uso de un anticuerpo monoclonal que se une al hGHR o a la hGHBP y cuya unión no se inhibe con la hGH
soluble, y que está dirigido al epítipo conformacional situado en los subdominios articulados I y II de la región ex-
tracelular del hGHR y es capaz de discriminar entre un hGHR activado e inactivo, comprendiendo el procedimiento
10 las siguientes etapas: poner en contacto el anticuerpo monoclonal y el hGHR para que formen un complejo, poner en
contacto un ligando candidato con el complejo, medir la unión del anticuerpo al hGHR y de este modo discriminar
entre una conformación del hGHR activada y una inactiva.

2. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que la región extracelular del hGHR es la proteína de unión a la
hormona de crecimiento humano (hGHBP).

15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2 para seleccionar un ligando capaz de la activación o la inactivación
del hGHR.

4. Procedimiento según la reivindicación 3 para seleccionar un agonista de la hormona de crecimiento humana
(hGH) o un antagonista de hGH.

20 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que se añade hGH.

25

30

35

40

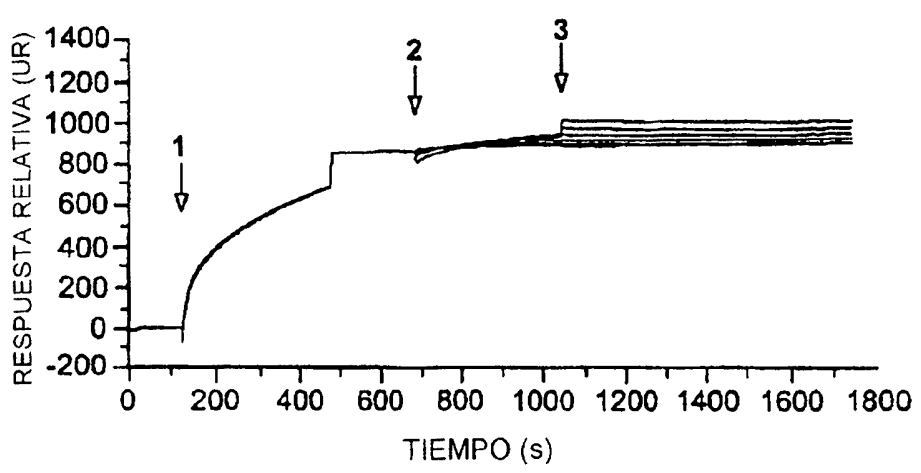
45

50

55

60

65



A

FIG. 1A

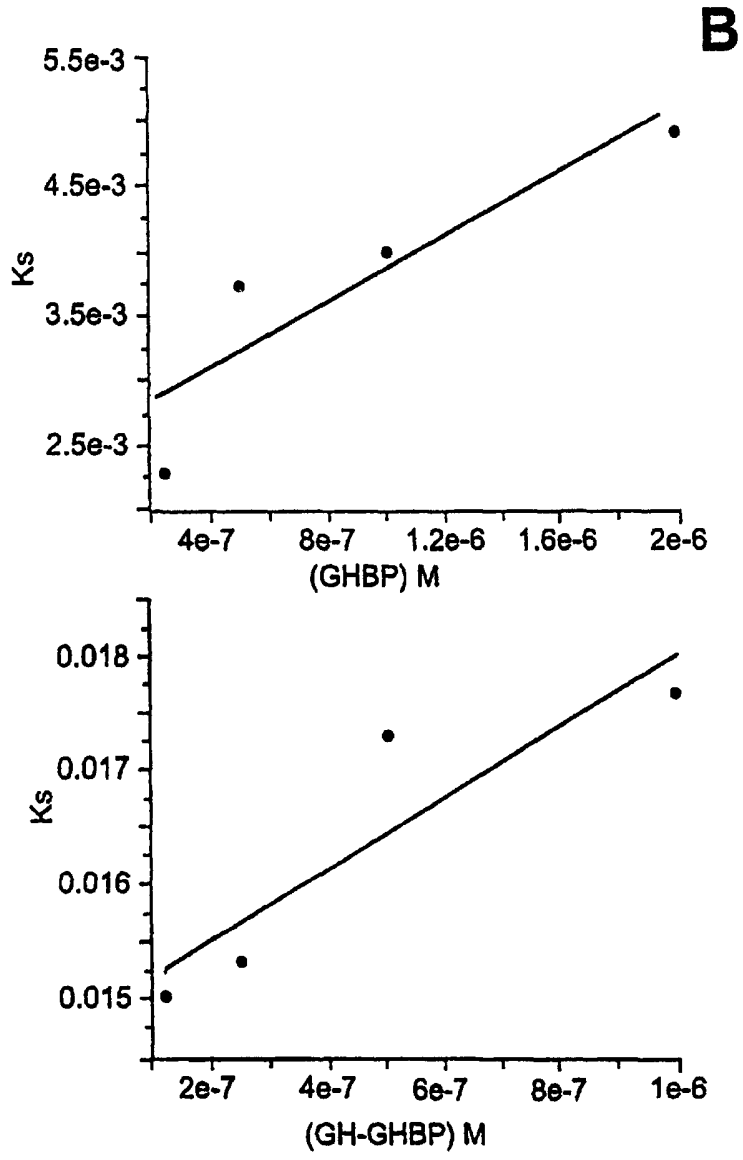


Fig. 1B

C

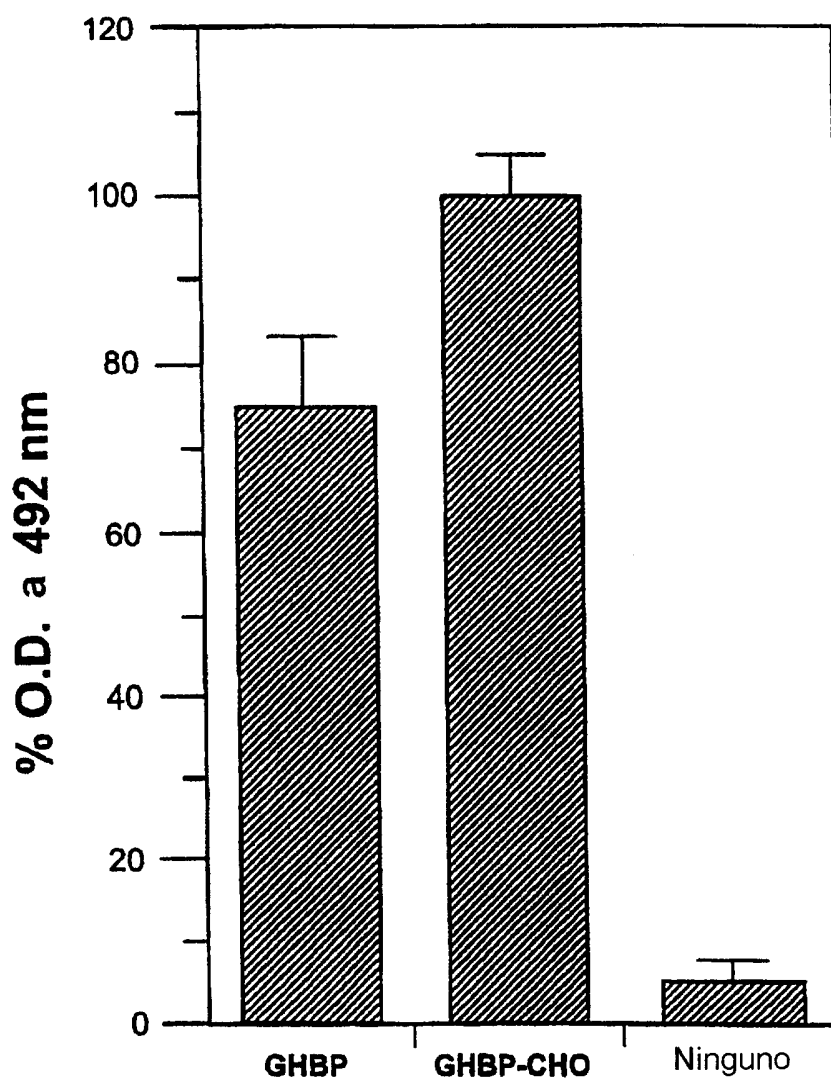


FIG. 1C

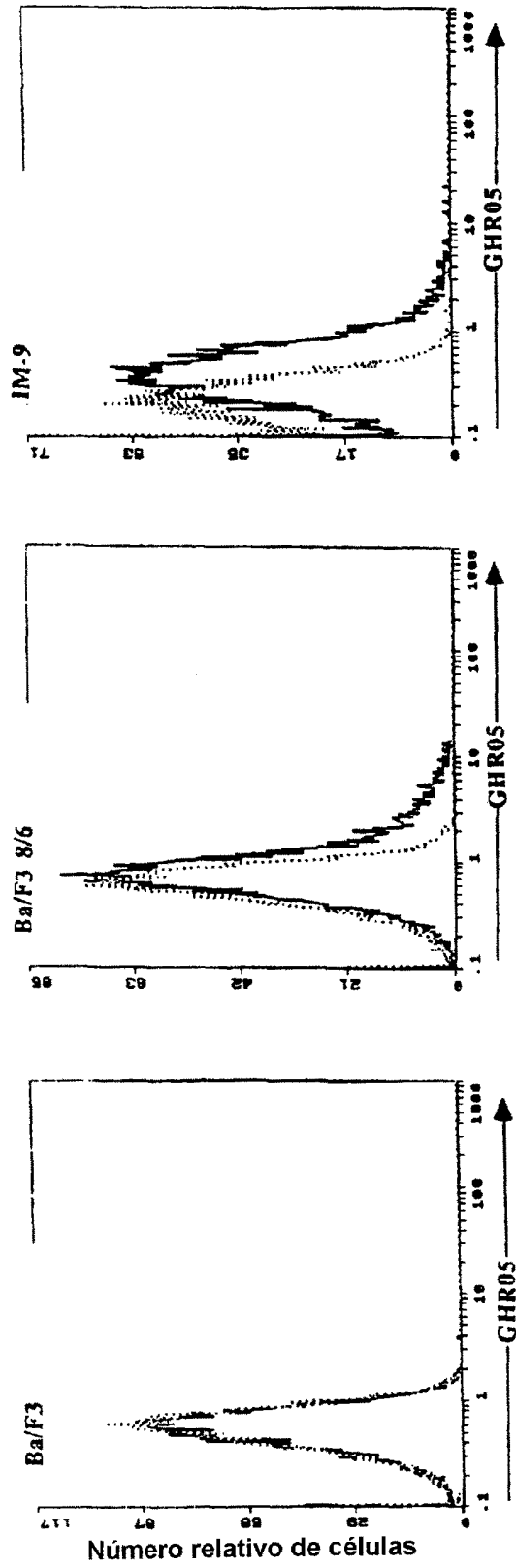


FIG. 2

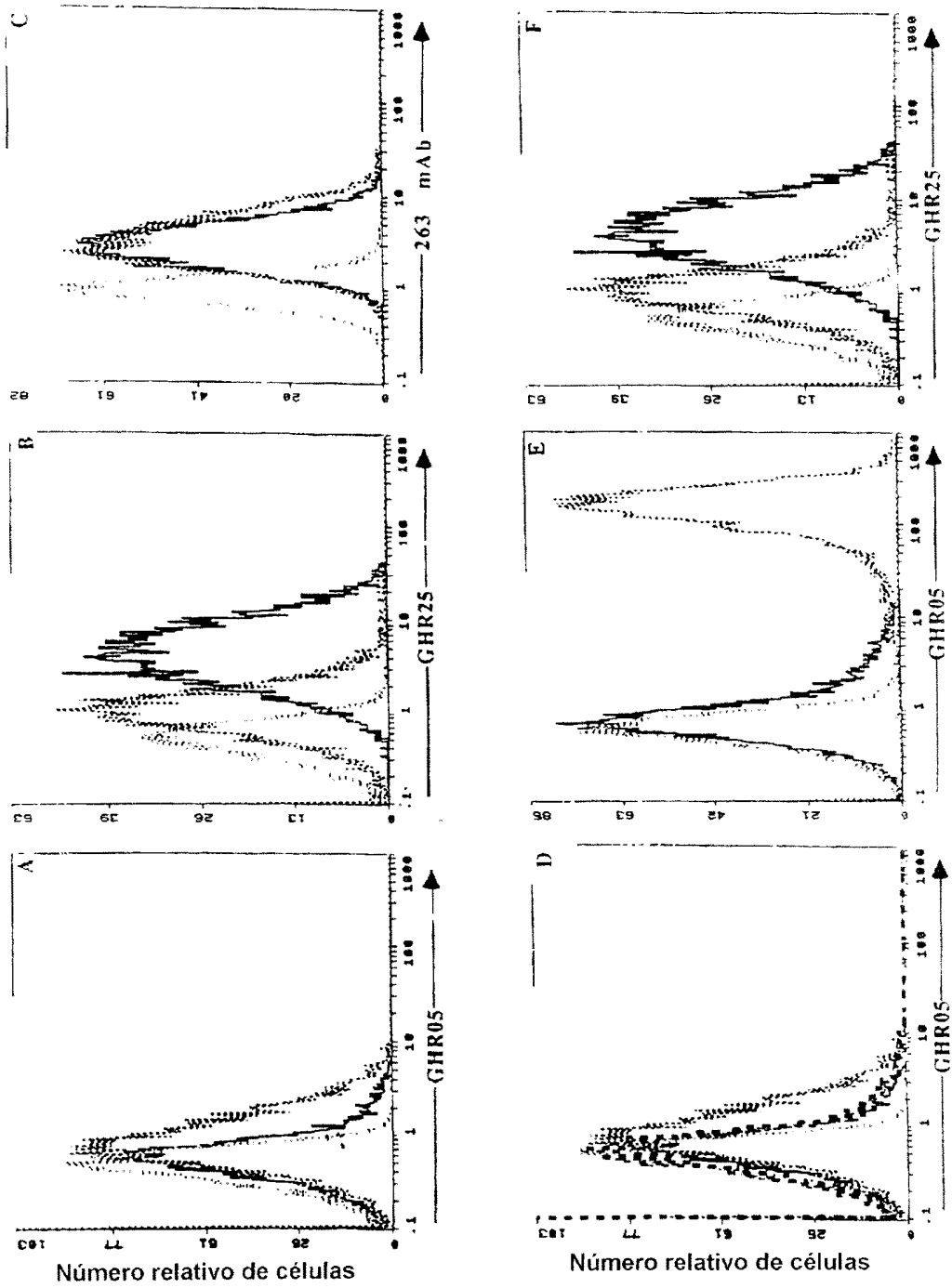


Fig. 3

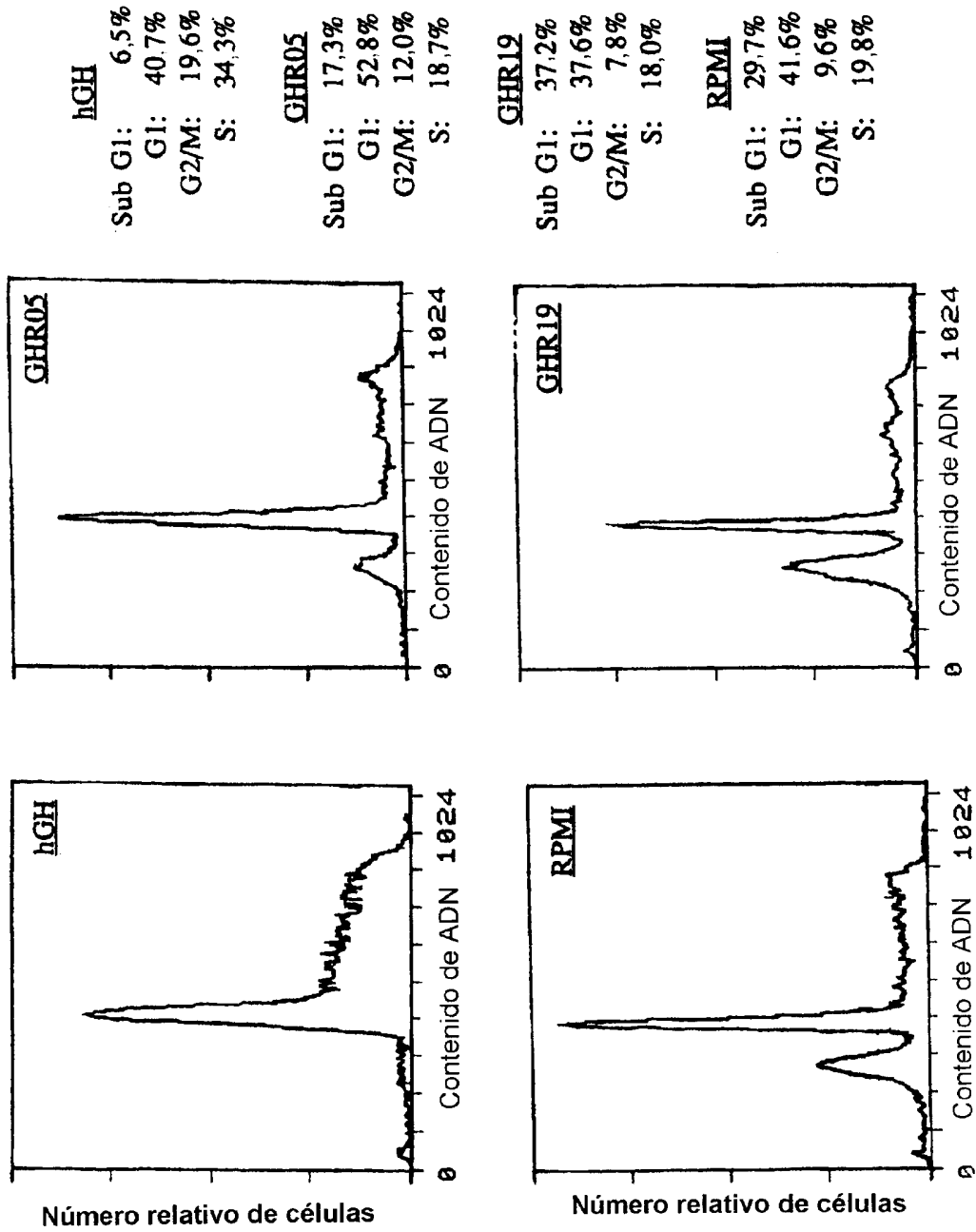


FIG. 4

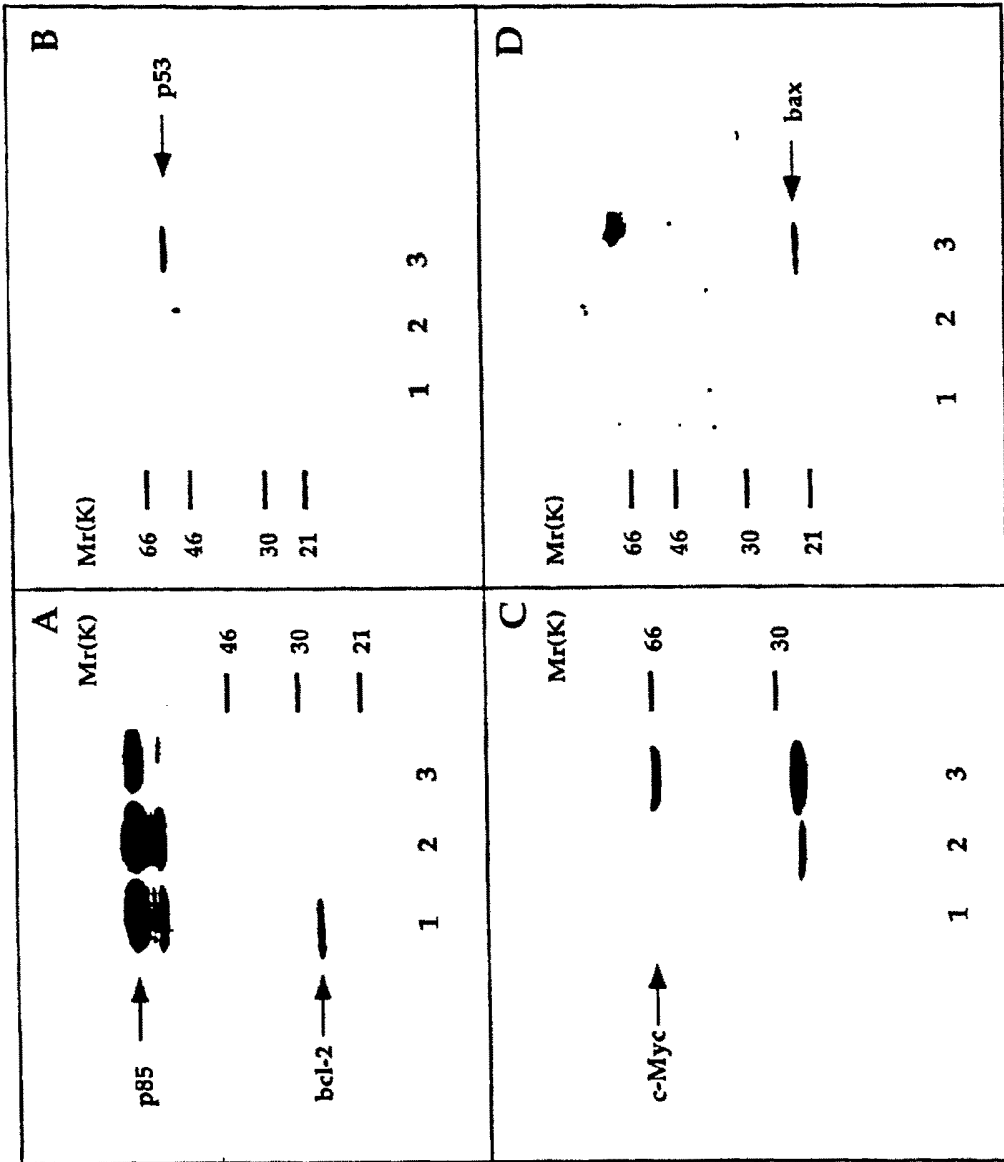


Fig. 5

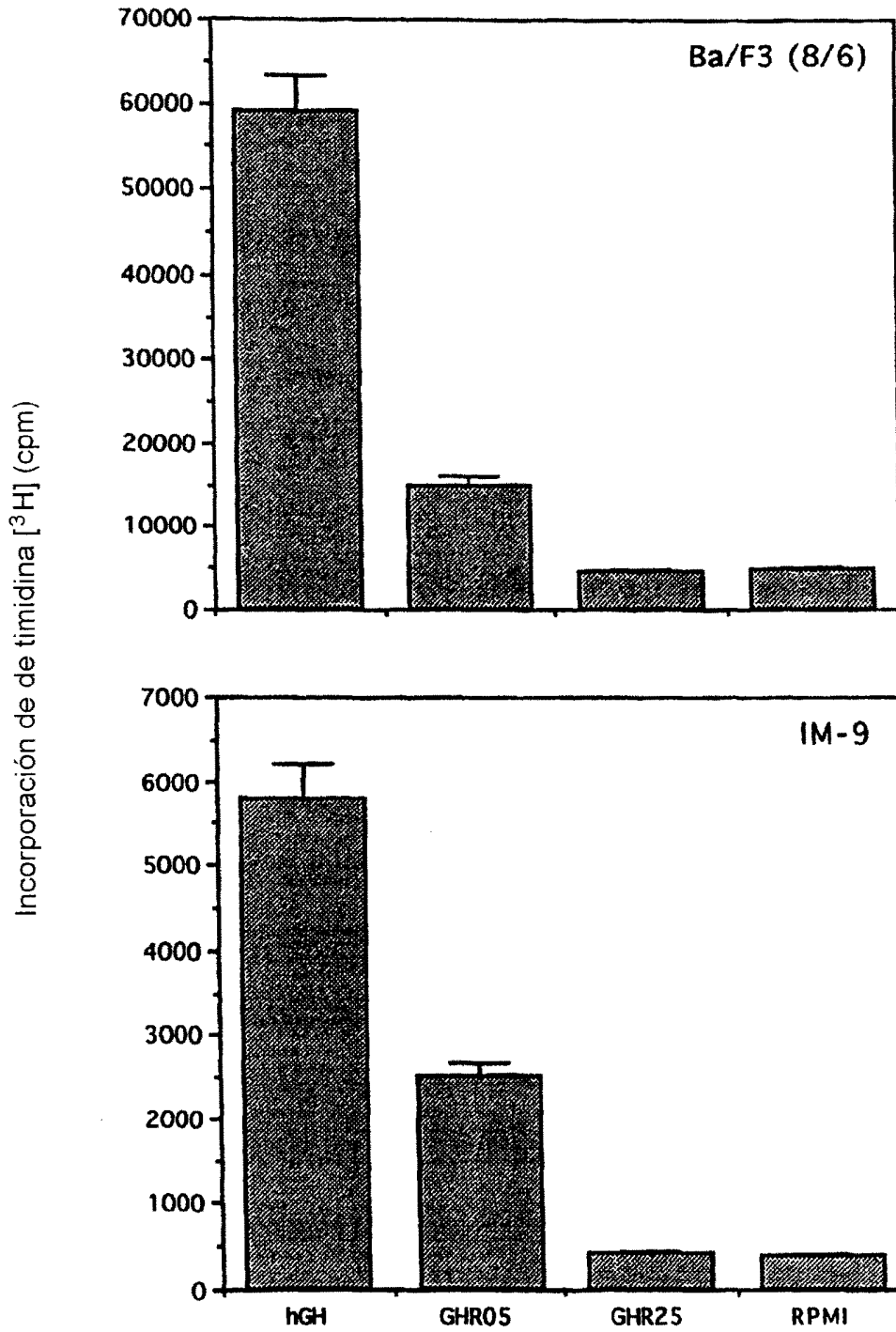


Fig. 6

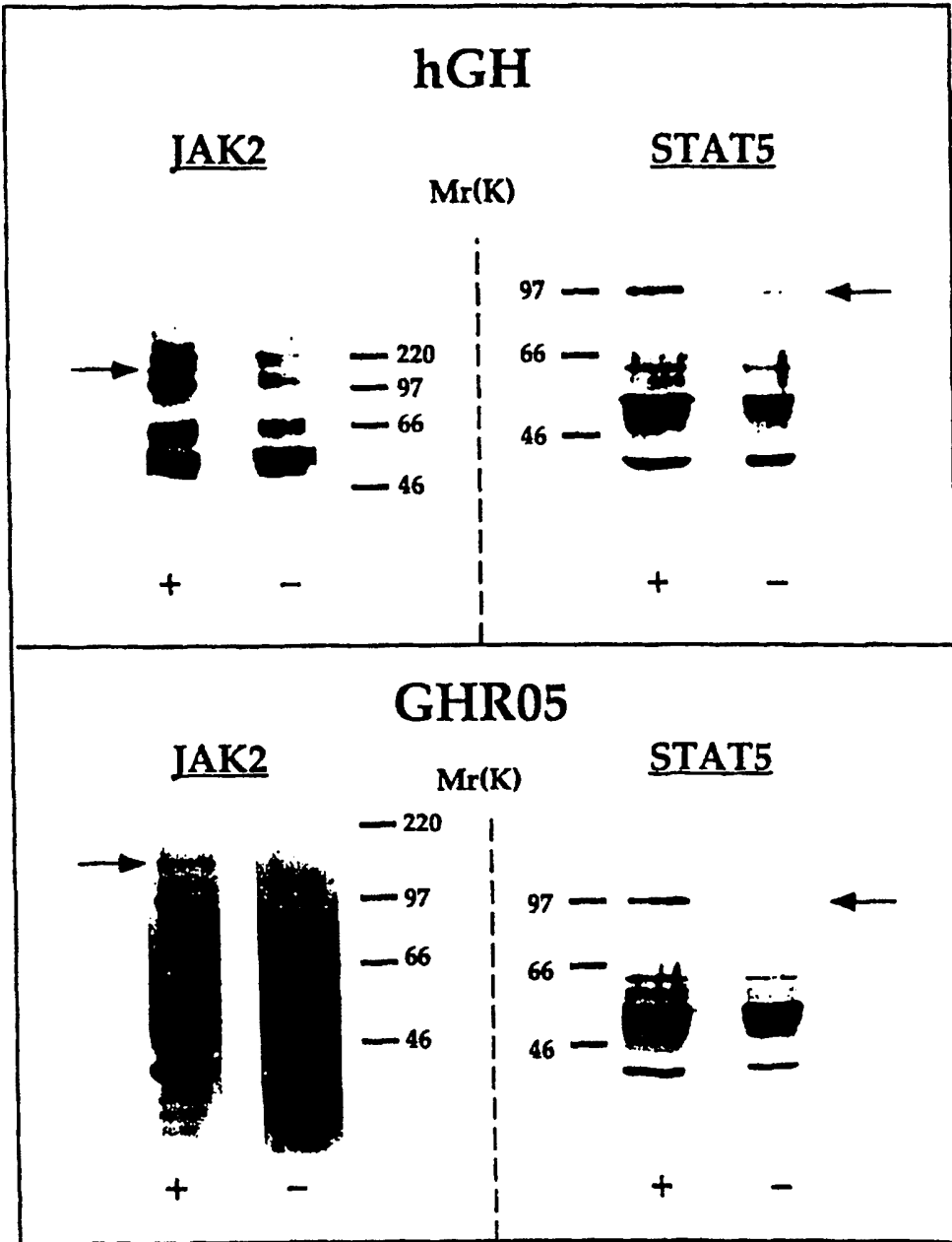


Fig. 7