



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 192 199**

51 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

86 Número de solicitud europea: **95916204 .1**

86 Fecha de presentación : **04.04.1995**

87 Número de publicación de la solicitud: **0758381**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.02.1997**

54 Título: **Ligandos de la familia EPH biológicamente activos.**

30 Prioridad: **04.04.1994 US 222075**
12.04.1994 US 229402
01.09.1994 US 299567
21.10.1994 US 327423

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.10.2003**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **01.07.2007**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **01.07.2007**

73 Titular/es: **REGENERON PHARMACEUTICALS, Inc.**
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, New York 10591-6707, US

72 Inventor/es: **Davis, Samuel;**
Gale, Nicholas;
Aldrich, Thomas H.;
Maisonpierre, Peter C.;
Goldfarb, Mitchell y
Yancopoulos, George D.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 192 199 T5

DESCRIPCIÓN

Ligandos de la familia EPH biológicamente activos.

5 La presente invención proporciona métodos para potenciar la actividad biológica de formas solubles de ligandos que se unen a proteínas que pertenecen a la subfamilia Eph de proteínas tirosina quinasa de tipo receptor, tales como las Ehk (incluyendo Ehk-1, Ehk-2 y Ehk-3), Eck y Elk. Se refiere también a formas aglomeradas biológicamente activas del ligando y a un nuevo ligando que se une al receptor Ehk-1.

10 **Antecedentes de la invención**

La capacidad de los ligandos polipeptídicos de unirse a células y desencadenar así una respuesta fenotípica tal como el crecimiento, la supervivencia o la diferenciación celular está a menudo mediada por tirosina quinasa transmembránicas. La porción extracelular de cada receptor tirosina quinasa (RTK) es generalmente la porción más distintiva de la molécula, ya que proporciona a la proteína su característica reconocedora de ligando. La unión de un ligando al dominio extracelular da como resultado la transducción de una señal a través del dominio catalítico intracelular de la tirosina quinasa, que transmite una señal biológica a las proteínas diana intracelulares. El conjunto particular de motivos de secuencia de este dominio catalítico citoplasmático determina su acceso a potenciales sustratos de quinasa (Mohammadi, *et al.*, 1990, *Mol. Cell. Biol.*, 11: 5068-5078; Fanti *et al.*, 1992, *Cell*, 69: 413-413).

20 Los RTK parecen experimentar dimerización o algún cambio conformacional relacionado después de la unión del ligando (Schlessinger, J., 1988, *Trend Biochem. Sci.* 13: 443-447; Ullrich y Schlessinger, 1990, *Cell*, 61: 203-212; Schlessinger y Ullrich, 1992, *Neuron* 9: 383-391); las interacciones moleculares entre los dominios citoplasmáticos dimerizantes conducen a la activación de la función quinasa. En algunos casos, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el ligando es un dímero que se une a dos moléculas receptoras (Hart, *et al.*, 1988, *Science*, 240: 1529-1531; Heldin, 1989, *J. Biol. Chem.* 264: 8905-8912), mientras que, por ejemplo, en el caso de EGF, el ligando es un monómero (Weber, *et al.*, 1984, *J. Biol. Chem.*, 259: 14631-14636).

30 La distribución en el tejido de un receptor tirosina quinasa particular en organismos superiores proporciona datos relevantes respecto de la función biológica del receptor. Los receptores tirosina quinasa para algunos factores de crecimiento y diferenciación, tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), están ampliamente expresados, y por lo tanto parecen desempeñar algún papel general en el crecimiento y el mantenimiento del tejido. Los miembros de la familia de receptores Trk de RTK (Glass & Yancopoulos, 1993, *Trends in Cell Biol.*, 3: 262-268) están más generalmente limitados a células del sistema nervioso, y la familia del factor de crecimiento nervioso constituida por NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5 (conocidas como neurotrofinas), que se unen a estos receptores promueven la diferenciación de diversos grupos de neuronas en el cerebro y la periferia (Lindsay, R.M., 1993, en "Neurotrophic Factors", S.E. Loughlin & J.H. Fallon, eds., pág. 257-284 (San Diego, CA; Academic Press). La localización de uno de dichos receptores de la familia Trk, *trkB*, en el tejido proporcionó cierto conocimiento sobre el papel biológico potencial de este receptor, así como sobre los ligandos que se unen a este receptor (designados en la presente memoria como asociados). Por tanto, por ejemplo en ratones adultos, se encontró que *trkB* se expresaba preferiblemente en tejido cerebral, aunque se observaron también niveles significativos de ARNm de *trkB* en pulmón, músculo y ovarios. Además, se detectaron transcripciones de *trkB* en embriones de gestación media y tardía. El análisis de hibridación *in situ* de embriones de ratones de 14 y 18 días indicó que las transcripciones *trkB* se localizaban en los sistemas nervioso central y periférico, incluyendo cerebro, médula espinal y ganglios craneanos, tronco paravertebral del sistema nervioso simpático y diversas rutas de innervación, sugiriendo que el producto del gen *trkB* puede ser un receptor implicado en la neurogénesis y en el desarrollo nervioso inicial, así como puede desempeñar un papel en el sistema nervioso adulto.

45 El entorno celular en el que se expresa un RTK puede influir en la respuesta biológica exhibida tras la unión de un ligando al receptor. Por tanto, por ejemplo cuando se expone una célula neuronal que expresa un receptor Trk a una neurotrofina que se une a ese receptor, resulta la supervivencia y diferenciación neuronales. Cuando el mismo receptor se expresa por un fibroblasto, la exposición a la neurotrofina da como resultado la proliferación del fibroblasto (Glass, *et al.*, 1991, *Cell* 66: 405-413). Por tanto, parece que el dominio extracelular proporciona el factor determinante en cuanto a la especificidad del ligando, y una vez que la transducción de la señal se ha iniciado, el entorno celular determinará el resultado fenotípico de esa transducción de señal.

55 Se han identificado una serie de familias de RTK basándose en las homologías de secuencia en su dominio intracelular. El receptor y las rutas de transducción de la señal utilizados por NGF implican el producto del proto-oncogén *trk* (Kaplan, *et al.*, 1991, *Nature*, 350: 156-160; Klein, *et al.*, 1991, *Cell*, 65: 189-197). Klein, *et al.* (1989, *EMBO J.*, 8: 3701-3709) reseñaron el aislamiento de *trkB*, que codifica un segundo miembro de la familia de receptores de proteína tirosina quinasa que se ha encontrado que está altamente relacionado con el proto-oncogén humano *trk*. *TrkB* se une a y media las respuestas funcionales de BDNF, NT-4 y, en menor medida, NT-3 (Squinto, *et al.*, *Cell* 65: 885-903; Ip, *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3060-3064; Klein *et al.*, 1992, *Neuron*, 8: 947-956). A nivel de aminoácidos, se encontró que los productos de *trk* y *trkB* compartían 57% de homología en sus regiones extracelulares, incluyendo 9 de las 11 cisteínas presentes en *trk*. Esta homología se encontró que aumentaba al 88% en sus respectivos dominios catalíticos de tirosina quinasa. La familia del gen *Trk* se ha expandido ahora para incluir el locus *trkC*, habiéndose identificado NT-3 como el ligando preferido para *trkC* (Lamballe, *et al.*, 1991, *Cell* 66: 967-979; Valenzuela, *et al.*, 1993, *Neuron* 10: 963-974).

Las tirosina quinasas transmembránicas relacionadas con Eph comprenden la familia más grande conocida de tirosina quinasas de tipo receptor, exhibiendo muchos miembros una expresión específica en el sistema nervioso en desarrollo y adulto. Se identificaron dos nuevos miembros de la familia de RTK de Eph, denominados Ekh (quinasas con homología con eph)-1 y -2 utilizando un cribado basado en la reacción en cadena con polimerasa (PCR) de genes expresados en el cerebro (Maisonpierre, *et al.*, 1993, *Oncogene* 8: 3277-3388). Estos genes parecen expresarse exclusivamente en el sistema nervioso, empezando la expresión de Ekh-1 al inicio del desarrollo nervioso. Últimamente, se ha clonado un nuevo miembro de este grupo de receptores relacionados, Ekh-3 (Valenzuela, *et al.*, en prensa).

El gen *elk* codifica una proteína tirosina quinasa de tipo receptor que pertenece también a la subfamilia de eph, y que se expresa casi exclusivamente en el cerebro (y a niveles inferiores en los testículos) (Letwin, *et al.*, 1988, *Oncogene* 3: 621-678; Lhotak, *et al.*, 1991, *Mol. Cell. Biol.* 11: 2496-2502. Basándose en su perfil de expresión, el receptor Elk y su ligando asociado se espera que desempeñen un papel en las interacciones célula a célula en el sistema nervioso.

Al contrario que los receptor Ekh y Elk, el receptor estrechamente relacionado Eck parece funcionar de manera más pleiotrópica; se ha identificado en tejidos nervioso, epitelial y esquelético, y parece estar implicado en la gastrulación y la formación de patrones craneofaciales y de sitios de gemación de miembros en el embrión de ratón (Ganju, *et al.*, 1994, *Oncogene* 9: 1613-1624).

La identificación de un gran número de receptores tirosina quinasas ha superado en gran medida la identificación de sus ligandos asociados. En el mejor caso, la determinación de los tejidos en que dichos receptores se expresan proporciona conocimientos sobre la regulación del crecimiento, la proliferación y la regeneración de las células en los tejidos diana. Debido a que los RTK parecen mediar una serie de funciones importantes durante el desarrollo, sus ligandos asociados desempeñarán inevitablemente un papel crucial en el desarrollo.

Los inventores han encontrado una serie de moléculas de tipo receptor tirosina quinasa huérfanas, incluyendo cinco de dichas moléculas que son homólogas al receptor *trk* y a la familia del receptor de la insulina, y se describen otras cuatro moléculas que son homólogas, respectivamente, a CSF1R/PDGFR/kit; ret; eck-alfa (ahora conocida como Ekh-2); y eck beta (Ekh-1). En éstas, se describieron métodos en los que se utilizaron líneas celulares que expresaban Ekh-1 y Ekh-2 para ensayo de identificación de sus ligandos asociados. Debido a que las ekh parecen expresarse en distintas poblaciones neuronales, incluyendo algunos de los núcleos colinérgicos centrales ascendentes principales, los ligandos que se unen a estos receptores se esperaba que desempeñaran un papel en la promoción del crecimiento o la supervivencia de estas células neuronales. Debido a que la expresión de Ekh-1 empieza al inicio del desarrollo, sus ligandos asociados pueden desempeñar un papel en la embriogénesis.

Aunque se han desarrollado una serie de esquemas para la identificación de ligandos asociados para los muchos receptores huérfanos que se han identificado, se han identificado muy pocos de dichos ligandos, y los ligandos que se han identificado hasta la fecha parecen no tener más actividad que la capacidad de unirse a su receptor asociado. Por ejemplo, la publicación internacional número WO94/11020, publicada el 26 de mayo de 1994, describe ligandos que se unen al receptor Eck. En particular, se describe el ligando EBP (también conocido como B61). Sin embargo, aunque se describe la unión de B61 al receptor Eck, no se describe ninguna actividad biológica. De forma similar, a pesar de la descripción de la publicación PCT número WO94/11384 (publicada el 26 de mayo de 1994) de un ligando que se une al receptor Elk, no se observó actividad biológica, independientemente de si el ligando se presentaba como unido a membrana o en forma de un dímero Fc del ligando soluble. Con respecto al receptor Elk, sin embargo, se han utilizado receptores quiméricos EGFR-Elk (con el dominio extracelular de EGFR condensado con el dominio citoplasmático de Elk) para demostrar la integridad funcional (medida mediante autofosforilación estimulada por EGF) del dominio enzimático de este receptor. (Lhotak y Pawson, 1993, *Mol. Cell. Biol.* 13: 7071-7079).

Sumario de la invención

Según la invención, pueden utilizarse las formas solubles de los ligandos descritos en la presente memoria para promover respuestas biológicas en células que expresan los receptores Ekh-1, Ekh-2, Ekh-3, Eck y Elk. En particular, se describe un método general en la presente memoria que produce la "aglomeración" de ligandos para receptores relacionados con eph, que funciona haciendo biológicamente activos a ligandos solubles de otro modo inactivos, o que potencia la actividad biológica de ligandos que, ausente dicha aglomeración, tendrían sólo niveles bajos de actividad biológica.

En una realización, la invención proporciona un método de potenciación de la actividad biológica del dominio extracelular de un ligando de la familia de eph que comprende:

a) expresar el dominio soluble del ligando con un marcaje epitópico;

b) exponer el citado dominio soluble marcado a anticuerpos anti-marcaje para formar un ligando aglomerado de la familia de eph,

en el que dicha actividad biológica se mide mediante fosforilación del dominio de tirosina quinasa de un receptor de la familia de eph.

ES 2 192 199 T5

La invención proporciona también una preparación tratada con anticuerpo anti-epítipo de un ligando soluble aglomerado marcado con epítipo de la familia de eph que es obtenible mediante dicho método en el que el ligando de la familia de eph es Efl-1 (B61).

5 En una realización adicional, la invención proporciona un método de potenciación de la actividad biológica del dominio soluble de un ligando de la familia de eph seleccionado de Efl-1 (B61) que comprende:

a) expresar el dominio soluble del ligando con el dominio Fc de IgG; y

10 b) permitir que se formen dímeros Fc, en el que dicha actividad biológica se mide mediante fosforilación del dominio de tirosina quinasa de un receptor de la familia de eph.

La invención proporciona también un ligando soluble aglomerado biológicamente activo de la familia de eph que comprende (Efl soluble)_n, siendo Efl soluble el dominio extracelular de Efl-1 (B61) y n es 2 o más, en el que dicha actividad biológica se mide mediante fosforilación del dominio de tirosina quinasa de un receptor de la familia de eph.

Descripción de las figuras

Figura 1. Vector pJFE14.

20 Figura 2. Comparación de secuencia de los ligandos para los receptores Ehk-1 y Elk. Se presentan las secuencias alineadas de B61 (SEC N° ID 1), el ligando de Ehk-1 (EHK-1L) (SEC N° ID 2) y el ligando de Elk (ELK-L) (SEC N° ID 3). Los residuos compartidos por las tres secuencias están encuadrados, y los residuos compartidos por al menos dos se muestran en el carril de consenso; los puntos negros indican cisteínas conservadas, y los asteriscos delimitan los residuos que bordean las regiones principales conservadas. Las letras minúsculas muestran las secuencias de la supuesta señal aminoterminal, así como el dominio transmembránico de ELK-L y las colas hidrófobas de reconocimiento de GPI carboxilo terminales de B61 y EHK1-L.

Figura 3. Secuencia de nucleótidos de la región codificadora de EHK-1L (SEC N° ID 4).

30 Figura 4. Análisis de transferencia Northern de la expresión de Efl-1 (B61), Efl-2 (EHK-1L) y Efl-3 (ELK-L) en tejidos de rata adulta (A) y de cerebro en desarrollo (B). El ARN total (20 µg por carril) se aisló a partir de los tejidos indicados, se fraccionó en geles de formaldehído-agarosa al 1% y se transfirió a membranas de nailon. Las transferencias se hibridaron a sondas marcadas con ³²P derivadas de fragmentos de restricción internos de las regiones codificadoras de cada ADNc.

Figura 5. Activación de los receptores de la familia de Eph mediante ligandos unidos a membrana o aglomerados, medidos mediante la fosforilación de tirosina del receptor Elk. Figura 5A: Estimulación utilizando células COS de control transfectadas con el vector solo (COS-ficticia) o células COS transfectadas con una construcción de expresión que codifica Efl-3 (ELK-L); Figura 5B: Estimulación con Efl-3 soluble marcado con myc (ELK-L), utilizado como ligando no aglomerado (segundo y tercer pocillos) o ligando aglomerado por anticuerpos (cuarto y quinto pocillos). (“+Ab” indica ligandos solubles aglomerados con anticuerpo). Se muestra el control (0 ng/ml) en el primer pocillo. Figura 5C: Estimulación con Efl-1 soluble marcado con myc (B61), utilizado como ligando no aglomerado (segundo pocillo) o como ligando aglomerado por anticuerpos (tercer pocillo). El control (0 ng/ml) se muestra en el primer pocillo. Los paneles superiores en las figuras A, B y C muestran los inmunoprecipitados inmunotransferidos con anticuerpos ante fosfotirosina. Los paneles inferiores en las figuras A, B y C muestran inmunoprecipitados que se extrajeron y se volvieron a ensayar posteriormente con anticuerpos que reconocían los receptores para visualizar la proteína receptora total.

50 Figura 6: Inducción de respuestas de crecimiento en células BAF mediadas por el receptor quimérico Eck: A. Las estimulaciones fueron con Efl-2 soluble (EHK-1L) producido en células COS con o sin aglomeración posterior. B. Las estimulaciones fueron con Efl-1 soluble (B61) producido en células COS con o sin aglomeración posterior.

Figura 7: Inducción de la fosforilación de tirosina del receptor ELK mediante ligando aglomerado pero no dimérico. Carril A: sobrenadantes COS ficticios sin anticuerpos anti-humanos; carril B: anticuerpos anti-humanos; carril C: ELK-L-Fc sin anticuerpos reticulantes; y carril D: anticuerpos reticulantes. El ligando ELK soluble marcado con Fc (ELK-L-Fc) se produjo como sobrenadante de células COS, y se utilizó en forma de ligando dimérico no aglomerado o ligando aglomerado por anticuerpos. Las concentraciones de ligando se estimaron cuantificando la cantidad de epítipo de Fc utilizando un ensayo ELISA. La aglomeración del ligando se consiguió añadiendo anticuerpos anti-humanos e incubando a temperatura ambiente durante 1 hora antes de estimular las células. Las células indicadoras eran fibroblastos NIH 3T3 transfectados con ELK. Las células se dejaron ayunar durante 4-6 horas en medio exento de suero, y después se estimularon durante 40 minutos con: después de la estimulación, las células se solubilizaron e inmunoprecipitaron con anticuerpos que reconocían los receptores. Los inmunoprecipitados se inmunotransfirieron con anticuerpos ante fosfotirosina.

65 Figura 8. Inducción de respuestas de crecimiento en células BAF mediadas por el receptor quimérico ECK. Las estimulaciones se realizaron con ligando EHK1 marcado tres veces con myc (EHK1L-m3) y B61 marcado tres veces con myc (B61-m3) producidos en células COS con o sin aglomeración posterior con anticuerpos anti-myc y

anti-ratón. Debido a que el dominio catalítico del receptor ECK no media la respuesta de crecimiento en células BAF, se introdujo en su lugar un receptor quimérico (en el que el ectodominio del receptor ECK se condensó con el dominio citoplasmático del receptor FGF) en células BAF para hacer a la línea celular indicadora.

- 5 Figura 9. Inducción de respuestas de crecimiento en células BAF mediadas por receptores quiméricos ECK. Las estimulaciones se realizaron con EHK1-L-Fc soluble y B61-Fc producidos en células COS con o sin la aglomeración posterior con anticuerpos anti-humanos.

Descripción detallada de la invención

10

La utilización de sistemas de ensayo que utilizan los receptores EHK-1, EHK-2, EHK-3, Eck y Elk ha conducido al descubrimiento de los ligandos asociados a estos receptores. Dichos ligandos son útiles para promover el crecimiento y la supervivencia *in vitro* de poblaciones celulares neuronales, epiteliales u otras que lleven receptores.

15

Los solicitantes han descubierto que el ligando B61 anteriormente identificado (Holzman, *et al.*, 1990, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 5830-5838) se une también a EHK-1, y que tanto los ligandos B61 como EHK-1 se unen también a EHK-2 y al receptor EHK-3, así como al receptor Eck.

20

Los ligandos descritos en la presente memoria se designan como Efl (ligandos de la familia de la tirosina quinasa transmembránica Eph). Las secuencias de aminoácidos de B61 (Efl-1) y EHK-1L (Efl-2), así como las secuencias del ligando Efl-3 de unión a Elk, que se describió en el documento WO 94/11020 (publicado el 26 de mayo de 1994), se indican en la figura 2. Se ha identificado un ligando adicional, que se une a EHK-1, EHK-2 y EHK-3, así como al receptor Eck, como Efl-4. El plásmido pJFE14 que codifica el ligando Efl-4 se depositó según los términos del Tratado de Budapest el 21 de octubre de 1994 como 75921.

25

Cuando se utilizan en la presente memoria, Efl-1, Efl-2, Efl-3 y Efl-4 incluyen moléculas funcionalmente equivalentes en las que los residuos de aminoácidos se sustituyen por residuos en la secuencia que dan como resultado un cambio silencioso. Por ejemplo, pueden sustituirse uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia por otro aminoácido de una polaridad similar que actúa como un equivalente funcional, dando como resultado una alteración silenciosa. Los sustitutos de un aminoácido en la secuencia pueden seleccionarse de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

35

Las células que expresan Efl pueden hacerlo naturalmente o pueden estar genéticamente modificadas para producir estos ligandos, como se ha descrito anteriormente, mediante transfección, transducción, electroporación, microinyección, a través de un animal transgénico, etc. de ácido nucleico que codifica los Efl descritos en la presente memoria en un vector de expresión adecuado. Los vectores que contienen el ADNc que codifica Efl-2 (EHK-1L) se depositaron en la "American Type Culture Collection" según los términos del Tratado de Budapest el 4 de abril de 1994 en forma de un pJFE14 que contenía EHK-1L2B4 y EHK-1L3B1, y se les han dado las denominaciones ATCC 75728 y 75729, respectivamente. (Los ligandos codificados por estos vectores son idénticos). El vector pJFE14 que contiene el ADNc que codifica Efl-3 (ELK-L) se depositó en la "American Type Culture Collection" según los términos del Tratado de Budapest el 12 de abril de 1994 en forma de un pJFE14 que contenía *efl-3*, y se le ha dado la denominación ATCC 75734. El vector pJFE14 que contenía el ADNc que codificaba Efl-4 se depositó en la "American Type Culture Collection" según los términos del Tratado de Budapest el 21 de octubre de 1994 en forma de un pJFE14 que codificaba Efl-4, y se le ha dado la denominación ATCC 75921.

40

45

Además, la presente invención comprende el uso de los ligandos descritos en la presente memoria en formas solubles y formas marcadas.

50

Cualquiera de los métodos conocidos por un experto en la técnica para la inserción de fragmentos de ADN en un vector puede utilizarse para construir vectores de expresión que codifican Efl utilizando señales de control transcripcional/traduccionales apropiadas y las secuencias codificadoras de la proteína. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN recombinante y sintéticas *in vitro* y recombinaciones *in vivo* (recombinación genética). La expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica los Efl o los fragmentos peptídicos de los mismos puede regularse mediante una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que la proteína o el péptido se exprese en un hospedador transformado con la molécula de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de los Efl descritos en la presente memoria puede controlarse mediante cualquier elemento promotor/potenciador conocido en la técnica. Los promotores que pueden utilizarse para controlar la expresión de los ligandos incluyen, pero sin limitación, la repetición terminal larga como se describe en Squinto *et al.* (1991, *Cell*, 65: 1-20); la región promotora inicial de SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, *Nature*, 290: 304-310), el promotor de CMV, la repetición terminal 5' de M-MuLV, el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, *et al.*, 1980, *Cell*, 22: 787-797), el promotor de timidina quinasa de herpes (Wagner, *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 144-1445), las secuencias reguladoras del gen de metalotioeína (Brinster, *et al.*, 1982, *Nature*, 296: 39-42); vectores de expresión procariótica tales como el promotor de la β -lactamasa (Villa-Komaroff, *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 3727-3731), o el promotor *tac* (DeBoer, *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 21-25), véase también "Useful proteins from recombinant bacteria", en *Scientific American*, 1980, 242: 74-94; elementos promotores de levaduras u otros hongos tales como

65

el promotor Gal 4, el promotor de ADH (alcohol deshidrogenasa), el promotor de PGK (fosfoglicerol quinasa), el promotor de fosfatasa alcalina, y las siguientes regiones de control transcripcional animal, que exhiben especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen de elastasa I, que es activa en células acinares pancreáticas (Swift *et al.*, 1984, *Cell*, 38: 639-646; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 50: 399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology*, 7: 425-515); la región de control del gen de la insulina, que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature*, 315: 115-122); la región de control del gen de la inmunoglobulina, que es activa en células linfoides (Grosschedl, *et al.*, 1984, *Cell*, 38: 647-658; Adames *et al.*, 1985, *Nature*, 318: 533-538; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7: 1436-1444); la región de control del virus del tumor mamario en ratón, que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder, *et al.*, 1986, *Cell*, 45: 485-495); la región de control del gen de la albúmina, que es activa en el hígado (Pinkert, *et al.*, 1987, *Genes and Devel.*, 1: 268-276); la región de control del gen de la alfa-fetoproteína, que es activa en el hígado (Krumlauf, *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5: 1639-1648; Hammer, *et al.*, 1987, *Science*, 235: 53-58); la región de control del gen de alfa 1-antitripsina, que es activa en el hígado (Kelsey, *et al.*, 1987, *Genes and Devel.*, 1: 161-171); la región de control del gen de beta-globina, que es activa en células mieloides (Mogram, *et al.*, 1985, *Nature*, 315: 338-340; Kollias, *et al.*, 1986, *Cell*, 46: 89-94); la región de control del gen de la proteína básica mielina, que es activa en células oligodendrocíticas del cerebro (Readhead, *et al.*, 1987, *Cell*, 48: 703-712); la región de control del gen de la cadena 2 ligera de miosina, que es activa en músculo esquelético (Shani, 1985, *Nature*, 314: 283-286); y la región de control del gen de la hormona de liberación gonadotrópica, que es activa en el hipotálamo (Mason, *et al.*, 1986, *Science*, 234: 1372-1378).

Por tanto, los vectores de expresión capaces de replicarse en un hospedador bacteriano o eucariótico que comprenden ácido nucleico que codifica Efl como se describe en la presente memoria pueden utilizarse para transfectar el hospedador y dirigir así la expresión de dichos ácidos nucleicos para producir las proteínas Efl, que pueden recuperarse después en forma biológicamente activa. Como se utiliza en la presente memoria, una forma biológicamente activa incluye una forma capaz de unirse al receptor relevante, tal como Ehk-1 o Elk, y causar una función diferenciada y/o influenciar el fenotipo de la célula que expresa el receptor. Dichas formas biológicamente activas inducirían, por ejemplo, la fosforilación del dominio tirosina quinasa del receptor Ehk-1 o Elk, o la estimulación de la síntesis de ADN celular.

Los vectores de expresión que contienen las inserciones de genes pueden identificarse mediante tres enfoques generales: (a) hibridación ADN-ADN, (b) presencia o ausencia de funciones de los genes “marcadores”, y (c) expresión de las secuencias insertadas. En el primer enfoque, la presencia de un gen ajeno insertado en un vector de expresión puede detectarse mediante hibridación ADN-ADN utilizando sondas que comprenden secuencias que son homólogas de un gen *efl* insertado. En el segundo enfoque, el sistema vector recombinante/hospedador puede identificarse y seleccionarse basándose en la presencia o la ausencia de ciertas funciones de genes “marcadores” (por ejemplo, actividad timidina quinasa, resistencia a anticuerpos, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de oclusión en baculovirus, etc.) causadas por la inserción de genes ajenos en el vector. Por ejemplo, si el gen *efl* se inserta en la secuencia del gen marcador del vector, los recombinantes que contienen la inserción pueden identificarse por la ausencia de la función del gen marcador. En el tercer enfoque, los vectores de expresión recombinante pueden identificarse ensayando el producto del gen ajeno expresado por el recombinante. Dichos ensayos pueden basarse, por ejemplo, en las propiedades físicas o funcionales del producto del gen *efl*, por ejemplo uniendo el ligando al receptor Ehk-1 o Elk o porción del mismo, que puede estar marcado, por ejemplo, con un anticuerpo detectable o porción del mismo, o mediante unión a anticuerpos producidos ante la proteína Efl o una porción de la misma.

El ligando Efl-2 (EHK-1L) parece tener cierta homología con el ligando B61 anteriormente identificado (designado en la presente memoria como Efl-1) [Holzman, *et al.*, 1990, *Mol. Cell. Biol.* 10: 5830-5838]. Como B61, Efl-2 termina en una secuencia hidrófoba C-terminal que parece codificar una secuencia de reconocimiento que le permite estar unido a GPI, y carece por tanto de un dominio intracelular. De hecho, el pretratamiento de células que expresan Efl-2 con fosfolipasa C parece reducir la unión al cuerpo receptor Ehk-1, confirmando por tanto que estas proteínas están unidas a PI. Efl-3 no se escinde de la superficie celular utilizando fosfolipasa C, y parece comprender una proteína transmembránica convencional con un dominio citoplasmático.

Los ligandos descritos en la presente memoria pueden producirse en formas unidas a membrana en sistemas de expresión de células animales, o pueden expresarse en forma soluble. Las formas solubles de los ligandos pueden expresarse utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Una estrategia utilizada habitualmente implica el uso de cebadores oligonucleótidos, uno de los cuales cubre el extremo N de la proteína, y el otro de los cuales cubre la región justo cadena arriba de un segmento hidrófobo de la proteína, que representa o bien el dominio de reconocimiento de la unión a GPI, o bien un dominio transmembránico de la proteína. El oligonucleótido que cubre la región C-terminal está modificado de modo que contiene un codón de paro antes del dominio hidrófobo. Los dos oligonucleótidos se utilizan para amplificar una versión modificada del gen que codifica una proteína que se secreta en lugar de estar unida a membrana. Como alternativa, puede utilizarse un sitio de restricción conveniente en el vector para insertar una secuencia alterada que elimine el dominio de reconocimiento del enlace GPI o el dominio transmembránico, dando por tanto como resultado un vector capaz de expresar una forma secretada de la proteína. La proteína soluble así producida incluiría la región de la proteína desde el extremo N-terminal hasta la región precedente al dominio de reconocimiento hidrófobo de GPI o dominio transmembránico.

Los solicitantes han descubierto que aunque los ligandos solubles producidos según la invención se unen a los receptores de la subfamilia de eph, dichos ligandos solubles tienen a menudo poca o ninguna actividad biológica. Dichos ligandos solubles se activan, según la presente invención, mediante “aglomeración” de ligandos. “Aglomeración”

ción”, como se utiliza en la presente memoria, designa cualquier método conocido por un experto en la técnica para crear multímeros a partir de las porciones solubles de los ligandos descritos en la presente memoria.

5 En una realización, un efl “aglomerado” es un dímero, preparado por ejemplo según la presente invención utilizando el dominio Fc de IgG (Aruffo, *et al.*, 1991, *Cell* 67: 35-44), que da como resultado la expresión del ligando soluble en forma de un homodímero unido por disulfuro. En otra realización, las formas secretadas de los ligandos se construyen con marcajes epítópicos en sus extremos C; los anticuerpos anti-marcaje se utilizan después para agregar los ligandos.

10 Como alternativa, los multímeros pueden prepararse mediante ingeniería genética y expresión de moléculas que están constituidas por la porción soluble o extracelular del ligando seguida por el dominio Fc de hIgG, seguido por las cremalleras de leucina c-jun o c-fos descritas anteriormente [Kostelny, *et al.*, *J. Immunol.* 148: 1547-1553 (1992)]. Puesto que estas cremalleras de leucina forman predominantemente heterodímeros, pueden utilizarse para impulsar la formación de heterodímeros cuando sean deseados. Respecto de las proteínas quiméricas descritas que utilizan crema-
15 lleras de leucina, estas pueden marcarse también con quelatos metálicos o un epítipo. Este dominio marcado puede utilizarse para purificación rápida mediante cromatografía de metal-quelato, y/o mediante anticuerpos, para permitir la detección en transferencias Western, inmunoprecipitación o reducción/bloqueo de la actividad en bioensayos.

20 Los ligandos solubles multiméricos se pueden preparar mediante la expresión como moléculas quiméricas utilizando bucles de engarce flexibles. Una construcción de ADN que codifica la proteína quimérica se diseña de tal modo que expresa dos o más dominios solubles o extracelulares condensados conjuntamente en serie (“cabeza a cabeza”) a través de un bucle flexible. Este bucle puede ser enteramente artificial (por ejemplo repeticiones de poliglicina interrumpida por serina o treonina a ciertos intervalos) o “tomarse prestado” de proteínas de origen natural (por ejemplo la región bisagra de hIgG). Las moléculas pueden modificarse por ingeniería genética, con lo que se varía la longitud y composición del bucle, para permitir la selección de moléculas de características deseadas. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los solicitantes creen que la adhesión a la membrana de los ligandos facilita la aglomeración de los li-
25 gandos, que a su vez promueve la multimerización y activación del receptor. Por tanto, según la invención, la actividad biológica del ligando soluble se consigue imitando, en solución, la aglomeración de ligandos asociados a membrana. Por tanto, un ligando soluble aglomerado biológicamente activo de la familia de eph comprende (Efl soluble)_n, siendo el efl soluble el dominio extracelular de un ligando que se une a un receptor de la familia de eph, y siendo n 2 o más. Como se describe en la presente memoria, Efl-1, Efl-2 y Efl-3 se hacen todos biológicamente activos según el proceso de la invención.

30 En cada caso, un experto en la técnica reconocerá que el éxito de la aglomeración requerirá el análisis de la actividad biológica utilizando bioensayos tales como los descritos en la presente memoria. Por ejemplo, como se muestra en la figura 5, a pesar del hecho de que la fosforilación del receptor está notablemente inducida mediante la estimulación de las células indicadoras que expresan receptores con células COS que sobreexpresan formas de membrana de los ligandos B61, Efl-2 y Efl-3, (Fig. 5A, carriles 1 y 2), no existe una fosforilación observable utilizando las formas solubles de estos ligandos (Fig. 5B, carriles 2 y 3, y Figura 5C, carril 2). Sin embargo, cuando las formas secretadas de los ligandos están marcadas con myc y se utilizan anticuerpos para aglomerar los ligandos, los ligandos solubles anteriormente inactivos inducen fuertemente la fosforilación de tirosina del receptor en células indicadoras que expresan receptores Elk y Ehk-1 (Figura 5B, carriles 4 y 5, Figura 5C, carril 3), así como la proliferación en células indicadoras que expresan un receptor quimérico Eck (Fig. 6A).

45 Aunque en algunos casos la dimerización del ligando es suficiente para inducir actividad biológica, los datos indicados en la figura 7 demuestran cómo, en ciertos casos, los métodos descritos en la presente memoria se utilizan para determinar la suficiencia de una técnica de aglomeración particular. Como se muestra en la figura 7 con el ligando Elk, la dimerización del ligando soluble utilizando Fc parece ser insuficiente para conseguir una respuesta biológica (Figura 7, carril C). Sin embargo, la aglomeración adicional del ligando según la invención utilizando anticuerpos anti-Fc dio como resultado un aumento sustancial de la actividad biológica (carril D).

50 En el caso del ligando B61, parece que se obtiene un bajo nivel de actividad biológica con el ligando soluble conseguido sin aglomeración; dicho bajo nivel de actividad biológica puede estar causado por el bajo nivel de “autoaglomeración”. Independientemente, los solicitantes han demostrado que incluso en el caso de efl tales como B61, que tienen cierta actividad biológica, la actividad puede potenciarse aglomerando según la presente invención.

Las células pueden expresar transitoriamente, o preferiblemente constitutiva y permanentemente, los Efl en forma nativa, o en forma soluble como Efl marcados o Efl aglomerados como se describe en la presente memoria.

60 Los factores recombinantes pueden purificarse mediante cualquier técnica que permita la posterior formación de una proteína estable biológicamente activa. Por ejemplo, y no a modo de limitación, los factores pueden recuperarse a partir de células o bien en forma de proteínas solubles o bien en forma de cuerpos de inclusión, de los que pueden extraerse cuantitativamente mediante clorhidrato de guanidinio 8 M y diálisis. Para purificar adicionalmente los factores, puede utilizarse cromatografía de intercambio iónico convencional, cromatografía de interacción hidrófoba,
65 cromatografía en fase inversa o filtración con gel.

El uso terapéutico potencial de ligandos asociados a Ehk-1 se ha sugerido anteriormente. En el cerebro adulto, las localizaciones celulares de *ehk-1* indicaban que el gen se expresa principalmente en neuronas, y alcanza sus niveles

más altos de expresión en poblaciones neuronales distintivas que incluyen algunos de los núcleos colinérgicos centrales ascendentes principales (región interpeduncular, tubérculo olfatorio y amígdalas laterales) y núcleos monoaminérgicos (*locus coeruleus*, rafe dorsal y sustancia negra). Las sondas de EHK-1 destacaron claramente la corteza piriforme de la región ventrolateral del cerebro anterior, el miembro horizontal de la banda diagonal, el tabique rostral y las neuronas asociadas a *indusium griseum* y a *tenia tecta*, en el hipocampo, en neuronas piramidales en CA3 y CA2, y algo más débilmente en CA1, en el colículo superior y en la corteza retrosplénica y las neuronas del *locus coeruleus*.

En el cerebro de rata adulta, EHK-1 puede observarse que destaca claramente en las ricas densidades neuronales asociadas a los núcleos interpedunculares y a la sustancia negra, las amígdalas basolaterales y laterales y la rafe dorsal. Las sondas de EHK-1 fueron capaces de una hibridación significativa a la capa granular del cerebelo, en células de Purkinje en el cerebelo y en células mitrales del bulbo olfatorio.

En embriones E13, las transcripciones de *ehk-1* son notablemente más abundantes en la cabeza que en el cuerpo. El día 1 post-natal (P1), las bandas alcanzan su nivel más alto en el cerebro, reduciéndose ligeramente en el cerebro adulto. Las bandas de EHK-1 se reducen en las muestras cerebelares durante la transición de P1 a adultos, sugiriendo que los sitios mayoritarios de expresión en el cerebro completo adulto están predominantemente fuera del cerebelo.

Exposiciones más largas demuestran que las bandas de *ehk-1* específicas nerviosas son también detectables en ARN de cultivos primarios de astrocitos de hipocampo. Esto es inesperado, porque el ARN en estudios de hibridación *in situ* indica que el gen *ehk* se expresa predominantemente en neuronas, no en células gliales. El examen de diversas líneas celulares establecidas ha indicado que *ehk-1* se expresa predominantemente en células derivadas de neuronas, incluyendo varias líneas de neuroepitelioma y neuroblastoma.

El receptor Elk se expresa también principalmente en el cerebro. Como consecuencia, se cree que el ligando de unión a Elk descrito en la presente memoria soportará la inducción de una función diferencial y/o influirá en el fenotipo, tal como el crecimiento y/o la supervivencia de células nerviosas que expresan este receptor.

El análisis de transferencia Northern (figura 4) reveló unos patrones restringidos y recíprocos de expresión para Efl-2 (EHK-1L) y Efl-1 (B61), en contraposición con una amplia distribución de Efl-3 (ELK-L). Como EHK-1, Efl-2 se expresa casi exclusivamente en el sistema nervioso central, con la notable excepción de la alta expresión en la piel, donde la expresión de EHK-1 es casi indetectable. En contraposición, Efl-1 (B61) se expresa principalmente en tejidos no neuronales (Fig. 4A; tiempos más largos de exposición revelan bajos niveles de B61 en la mayoría de las estructuras nerviosas). Al contrario que el receptor Elk, que se expresa sólo en el cerebro y los testículos, Efl-3 (ELK-L) se expresa ampliamente tanto en tejidos neuronales como no neuronales. En el cerebro, la expresión tanto de Efl-1 como de Efl-3, pero no de Efl-2, es sustancialmente mayor al inicio del desarrollo, y después se reduce (Figura 4B). Como con Efl-1 y Efl-3, los ligandos para otras tirosina quinasa receptoras específicas del sistema nervioso (tales como los ligandos neurotrofina para los receptores Trk) se expresan también en tejidos no neuronales (Maisonpierre, *et al.*, 1990, *Science* 247: 1446-1451; Maisonpierre, *et al.*, 1990, *Neuron* 5: 501-509), aparentemente porque sirven como factores derivados de diana para procesos axonales que inervan estos tejidos (Thoenen, H., 1991, *Trends Neurosci.* 14: 165-170). La expresión no neuronal de Efl-1 y Efl-3 presenta también la posibilidad de que sirvan como ligandos para miembros de la familia del receptor Eph, tales como Eck, que se expresan en células no nerviosas.

Los Efl descritos en la presente memoria, los fragmentos peptídicos de los mismos o derivados que incluyen ligandos aglomerados pueden formularse en un vehículo farmacológicamente adecuado para proporcionar composiciones farmacéuticas.

Las proteínas Efl, fragmentos peptídicos o derivados pueden administrarse por vía sistémica o local. Puede utilizarse cualquier modo de administración apropiado conocido en la técnica, incluyendo pero sin limitación intravenoso, intratecal, intraarterial, intranasal, oral, subcutáneo, intraperitoneal o mediante inyección local o implante quirúrgico. Se suministran también formulaciones de liberación sostenida.

Ejemplo 1

Clonación de expresión de ligandos de unión a EHK-1

Se cultivaron células COS-7 en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero fetal bovino al 10% (SFB), penicilina y estreptomycin (P/S) al 1% cada una y glutamina 2 mM en una atmósfera de CO₂ al 5%. La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (obtenida de June Biedler, Sloan-Kettering) se cultivó en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) con SFB al 10%, (P/S) y glutamina 2 mM. Se obtuvieron clones de ADNc de Efl humano completo mediante cribado de una biblioteca de ADNc de SHSY5Y en el vector pJFE14 expresado en células COS. Se obtuvieron clones de ADNc de Efl-4 humano completo cribando una biblioteca de ADNc de la línea celular 143B de osteosarcoma humano en el vector pJFE14 expresado en células COS. El vector pJFE14, como se muestra en la figura 1, es una versión modificada del vector pSR α (Takebe, *et al.*, 1988, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 466-472). La biblioteca se creó utilizando los dos sitios de restricción de BSTX1 en el vector pJFE14.

Las células COS-7 se transfectaron transitoriamente con la biblioteca pJFE14 o el vector de control mediante el protocolo de transfección con DEAE-dextrano. En resumen, se sembraron células COS-M5 a una densidad de 1,0 x 10⁶ células por placa de 100 mm 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se cultivaron en

ES 2 192 199 T5

DMEM exento de suero que contenía DEAE-dextrano 400 $\mu\text{g/ml}$, cloroquina 1 μM y glutamina 2 mM, y 1 μg del ADN apropiado durante 3-4 horas a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5%. Los medios de transfección se aspiraron y se reemplazaron por solución salina tamponada con fosfato con DMSO al 10% durante 2-3 minutos. Después de este “shock” de DMSO, las células COS-7 se dispusieron en DMEM con SFB al 10%, penicilina y estreptomycinina al 1% cada una y glutamina 2 mM durante 48 horas.

El cribado se realizó mediante la localización directa de la tinción de superficie utilizando un cuerpo receptor Ehk-1, que estaba constituido por el dominio extracelular de Ehk-1 condensado con la región constante de IgG1. Este cuerpo receptor se preparó de la siguiente manera: la porción Fc de la IgG1 humana, empezando por la región bisagra y extendiéndose hasta el extremo carboxilo de la molécula, se clonó a partir de ADNc de placenta utilizando PCR con oligonucleótidos correspondientes a la secuencia publicada de la IgG1 humana. Se incorporaron también sitios de restricción convenientes a los oligonucleótidos para permitir la clonación del fragmento PCR en un vector de expresión. Los vectores de expresión que contienen receptores completos se modificaron o bien mediante digestiones con enzimas de restricción, o bien mediante estrategias de PCR para reemplazar los dominios transmembránicos e intracelulares por sitios de restricción que permiten la clonación del fragmento de IgG1 humana en estos sitios; esto se realizó de tal manera que generara una proteína de fusión con el ectodominio del receptor como su extremo amino, y la porción Fc de la IgG1 humana como su extremo carboxilo. Un método alternativo de preparación de cuerpos receptores se describe en Goodwin, *et al.*, 1993, *Cell* 73: 447-456).

En resumen, se transfectó un disco de 100 mm de células COS con 1 μg de ADN de plásmido de una biblioteca SHSY5Y. Dos días después de la transfección, las células se ensayaron incubándolas durante 30 minutos con Ehk-1IgG (en forma de sobrenadantes de células COS). Después, las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con metanol, y después se incubaron durante 30 minutos adicionales con PBS/suero bovino de ternera al 10%/conjugado de IgG anti-humana-fosfatasa alcalina. Después de tres lavados con PBS, las células se incubaron en sustrato de fosfatasa alcalina durante 30-60 minutos. En el disco se inspeccionó después microscópicamente la presencia de células de superficie teñida. Para cada célula teñida, se rascó del disco una pequeña área a su alrededor utilizando una punta de pipeta de plástico, se recuperó después el ADN de plásmido y se utilizó para electroporar células bacterianas. El ADN de plásmido preparado a partir de cultivos derivados de estas electroporaciones se utilizó para transfectar células COS para una segunda serie de enriquecimiento. La segunda serie se realizó con técnicas estándar en cubeta. Después de la segunda serie de enriquecimiento, se recogieron colonias bacterianas individuales y en el ADN de plásmido preparado a partir de estas colonias se ensayó su capacidad de inducir la tinción de Ehk-1 en células COS transfectadas con ellas.

Se identificaron tres clones de la biblioteca de SY5Y que exhibían unión el cuerpo receptor Ehk-1. El primero se identificó como B61. El segundo y tercer clones, que son idénticos y se designan en la presente memoria como Efl-2, parecen ser diferentes pero relacionados con B61, como se determinó utilizando una secuenciación parcial de nucleótidos, sugiriendo que estos pueden ser miembros de la familia de B61. Los tres ligandos parecen estar unidos a la membrana. Además, como B61, Efl-2 está unido a GPI.

La biblioteca derivada de la línea celular de osteosarcoma humano dio como resultado un clon que codifica Efl-4. Este ligando se une a los receptores Ehk-1, Ehk-2, Ehk-3 y Eck, pero no al receptor Elk.

Ejemplo 2

Clonación de Efl

Pueden utilizarse regiones de homología entre B61 y Efl-2 para identificar Efl adicionales como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos número de serie 08/144.992. Por ejemplo, la figura 2 revela dos de dichas regiones de homología de secuencia que llevan respectivamente las secuencias de aminoácidos de una letra V(F/Y) WNSSN (SEC N° ID 5) y NDY(V/L)DI(I/Y)CPHY (SEC N° ID 6), indicando las letras entre paréntesis residuos que difieren en B61 humano y de rata, en comparación con la proteína Efl-2 deducida. Los oligodesoxinucleótidos degenerados correspondientes a estas regiones conservadas de proteína pueden diseñarse y utilizarse después para cebar reacciones PCR utilizando ADNc preparados a partir de diversos tejidos, incluyendo cerebro embrionario y adulto. Los fragmentos de ADN amplificado resultantes pueden clonarse después mediante inserción en plásmidos, someterse a secuenciación de ADN, y después estas secuencias pueden compararse con las de los Efl conocidas.

Ejemplo 3

Clonación de expresión de ligando de unión a Elk

Se cultivaron células COS-7 en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero fetal bovino (SFB) al 10%, penicilina y estreptomycinina (P/S) al 1% cada una y glutamina 2 mM en una atmósfera de CO_2 al 5%. La línea de neuroepitelioma humano CHP100 (obtenida de) se cultivó en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) con FBS al 10%, (P/S) y glutamina 2 mM.

Los clones de ADNc de Efl humano completo se obtuvieron cribando una biblioteca de ADNc de CHP100 en el vector pJFE14 expresado en células COS. Este vector, como se muestra en la figura 1, es una versión modificada del vector pSR_α (Takebe, *et al.*, 1988, *Mol. Cell. Biol.* 8: 466-472). La biblioteca se creó utilizando los dos sitios de restricción BSTX1 en el vector pJFE14.

ES 2 192 199 T5

Las células COS-7 se transfectaron transitoriamente o bien con la biblioteca de pJFE15 o bien con el vector de control mediante el protocolo de transfección por DEAE-dextrano. En resumen, las células COS-M5 se sembraron a una densidad de $1,0 \times 10^6$ células por placa de 100 mm 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, las células se cultivaron en DMEM exento de suero que contenía DEAE-dextrano $400 \mu\text{g/ml}$, cloroquina $1 \mu\text{M}$ y glutamina 2 mM , y $1 \mu\text{g}$ del ADN apropiado durante 3-4 horas a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5%. Los medios de transfección se aspiraron y se reemplazaron por solución salina tamponada con fosfato con DMSO al 10% durante 2-3 minutos. Después de este “shock” con DMSO, las células COS-7 se dispusieron en DMEM con SFB al 10%, penicilina y estreptomina al 1% cada una y glutamina 2 mM durante 48 horas.

El cribado se realizó mediante localización directa de la tinción en superficie utilizando un cuerpo receptor Elk, que estaba constituido por el dominio extracelular de Elk condensado con la región constante de IgG1. Este cuerpo receptor se preparó de la siguiente manera: la porción Fc de la IgG1 humana, empezando por la región bisagra y extendiéndose hasta el extremo carboxilo de la molécula, se clonó a partir de ADNc de placenta utilizando PCR con oligonucleótidos correspondientes a la secuencia publicada de la IgG1 humana. Se incorporaron también sitios de restricción convenientes a los oligonucleótidos para permitir la clonación del fragmento de PCR en un vector de expresión. Los vectores de expresión que contienen receptores completos se modificaron o bien mediante digestiones con enzimas de restricción o bien mediante estrategias PCR para reemplazar los dominios transmembránicos e intracelulares por sitios de restricción que permiten la clonación del fragmento de IgG1 humana en estos sitios; esto se realizó de tal manera que generarse una proteína de fusión con el ectodominio receptor como su extremo amino y la porción Fc de la IgG1 humana como su extremo carboxilo. Un método alternativo de preparación de cuerpos receptores se describe en Goodwin, *et al.*, 1993, *Cell* 73: 447-456).

En resumen, se transfectó un disco de 100 mm de células COS con $1 \mu\text{g}$ de ADN de plásmido de la biblioteca de CHP100. Dos días después de la transfección, las células se ensayaron incubándolas durante 30 minutos con Elk-IgG (en forma de sobrenadantes de células COS). Después, las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con metanol y se incubaron después durante 30 minutos adicionales con PBS/suero bovino de ternero al 10%/conjugado anti-IgG humana-fosfatasa alcalina. Después de tres lavados con PBS, las células se incubaron en sustrato de fosfatasa alcalina durante 30-60 minutos. En el disco se inspeccionó después microscópicamente la presencia de células de superficie teñida. Para cada célula teñida, se rascó una pequeña área del disco a su alrededor utilizando una punta de pipeta de plástico, y el ADN de plásmido se recuperó después y se utilizó para electroporar células bacterianas. El ADN de plásmido preparado a partir de cultivos derivados de estas electroporaciones se utilizó para transfectar células COS para una segunda serie de enriquecimiento. La segunda serie se realizó con técnicas estándar de cubeta. Después de la segunda serie de enriquecimiento, se recogieron colonias bacterianas individuales y en el ADN de plásmido preparado a partir de estas colonias se ensayó su capacidad de inducir la tinción de Elk en células COS transfectadas con ellas.

Se identificó un clon que exhibía unión al cuerpo receptor Elk, se depositó en la ATCC el 12 de abril de 1994, y se designó como 75734.

Ejemplo 4

Activación de los Efl solubles

Se realizaron ensayos de Efl unidos a membrana haciendo crecer células COS transfectadas con vector solo (COS ficticia) o células COS transfectadas con el vector de expresión de Efl-3, separando las células de los discos con PBS + EDTA 1 mM , sedimentando y resuspendiendo en PBS. Las células se dispusieron en capas sobre líneas celulares indicadoras.

Se produjeron Efl-3 (Elk-1) y Efl-1 (B61) solubles, cada uno marcado utilizando el epítipo myc en sus extremos C [Stahl, *et al.*, *Science* 263, 92-95 (1994)] en forma de sobrenadantes de células COS, y se utilizaron como ligandos no aglomerados o ligandos aglomerados por anticuerpos. Las concentraciones de ligando se estimaron mediante la cuantificación del epítipo myc en transferencia en ranura; la aglomeración de ligando se consiguió añadiendo anticuerpos monoclonales anti-myc y anticuerpos policlonales anti-ratón, e incubando a 37°C durante 1 hora antes de estimular las células. Las líneas celulares indicadoras eran fibroblastos 3T3 transfectados con Elk (Figuras 5A y 5B) o células C2C12 transfectadas con Efl-1 (Figura 5C). Las células indicadoras en discos de 10 cm se hicieron ayunar durante 4-6 horas en medio exento de suero y después se estimularon durante 15 minutos como se ha observado anteriormente, a continuación se solubilizaron e inmunoprecipitaron con anticuerpos que reconocen los receptores. Los inmunoprecipitados se inmunotransfirieron con anticuerpos ante fosfotirosina (Figura 5, PANELES SUPERIORES), y posteriormente se extrajeron y se volvieron a ensayar con anticuerpos que reconocían los receptores para visualizar la proteína receptora total (Figura 5, PANELES INFERIORES).

Para medir la inducción de las respuestas de crecimiento en células BAF mediadas por receptores quiméricos Eck, se realizaron estimulaciones con Efl-2 (Efl-2) y B61 (Efl-1) solubles producidos en células COS con o sin aglomeración posterior. Después de dos días de estimulación, el número de células viables se evaluó añadiendo el tinte MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) durante 4 horas, seguido de solubilización y determinación de la densidad óptica (DO) como se ha descrito anteriormente [Ip, *et al.*, 1993, *Neuron* 10: 137-149] (Figura 8). Los datos descritos en la figura 9 son el resultado de ensayos MTT realizados como anteriormente con Efl-1L-Fc y B61-Fc solubles producidos en células COS con y sin la aglomeración posterior con anticuerpos anti-Fc. Debido a que el dominio catalítico del receptor Eck no media las respuestas de crecimiento en células BAF, se

introdujo en su lugar un receptor quimérico (en el que el ectodominio del receptor Eck estaba condensado con el dominio citoplasmático del receptor FGF) en células BAF para hacer una línea celular indicadora.

5 Como muestra la figura 5B, carriles 2 y 3, y la figura 5C, carril 2, no se observó activación del receptor inducida por el ligando, a juzgar por la fosforilación del receptor, utilizando formas solubles de Elk-1 (Efl-3) o B61 (Efl-1). Sin embargo, la fosforilación del receptor aumentó notablemente al estimular las células indicadoras que expresan el receptor con células COS que sobreexpresan las formas unidas a membrana de estos ligandos (por ejemplo, Fig. 5A, carriles 1 y 2). Para explicar esta discrepancia, los inventores especularon que la adhesión a la membrana facilita la aglomeración del ligando, que a su vez promueve la multimerización y activación del receptor. Para imitar la aglomeración del ligando en solución, se construyeron formas secretadas de los ligandos con marcajes epitópicos en sus extremos C; se utilizaron después anticuerpos frente a los marcajes para agregar los ligandos. Este tipo de aglomeración posibilitó que los ligandos solubles anteriormente inactivos indujeran fuertemente la fosforilación de tirosina del receptor en células indicadoras que expresan receptores Elk y Ehk-1 (Fig. 5B, carriles 1-5 y Fig. 5C, carriles 1-3). De forma similar, como muestra la figura 7 con respecto a Efl-3 (ELK-L), la dimerización del ligando es insuficiente para inducirlo a ser biológicamente activo, mientras que los multímeros tenían una actividad significativa. Estos resultados demuestran la necesidad, como se describe en la presente memoria, de evaluar la eficacia de un mecanismo particular de aglomeración en lo que se refiere a cada ligando particular.

20 Dicha eficacia de la aglomeración puede determinarse midiendo la fosforilación del receptor. O como alternativa, la proliferación en las células indicadoras que expresan un receptor o receptor quimérico apropiado, tal como el receptor quimérico Eck utilizado en experimentos cuyos resultados se muestran en la figura 6.

Los estudios de respuesta a la dosis demostraron que la aglomeración daba como resultado una potencia al menos 100 veces superior y respuestas saturables a bajas concentraciones de ligando (comparables a aquellas observadas con ligandos para otras familias de receptores [Ip, *et al.*, *Neuron* 10: 137-149 (1993)], tanto en el ensayo de fosforilación (ensayado para el ligando Elk, datos no mostrados), como en el ensayo de proliferación (ensayado para Efl-1 y B61, fig. 6). El pequeño efecto del B61 no aglomerado (Fig. 6B) es evocador del reciente descubrimiento de que altas concentraciones de B61 soluble podían inducir la fosforilación de tirosina de Eck [Bartley, *et al.*, *Nature* 368: 558-560 (1994); en este último estudio, la saturación no se consiguió siquiera a concentraciones de 1-2 mg/ml de B61. Estos efectos podrían ser atribuidos a una baja capacidad del ligando soluble mismo de dimerizar o agregar o bien espontáneamente o como resultado de la purificación. Los ligandos solubles se cree que activan sus receptores en virtud de ser divalentes o multivalentes [Schlessinger, J. & Ullrich, A., *Neuron* 9: 383-391 (1992)]; algunos ligandos son monómeros que contienen dos sitios de unión a receptor distintos, mientras que otros consiguen la divalencia en forma de dímeros unidos covalente o no covalentemente. Los resultados de los inventores definen una nueva clase de ligandos que parecen ser ineficaces en forma de ligandos solubles, posiblemente debido a que son monovalentes, pero que pueden activarse artificialmente en solución mediante aglomeración. Estos ligandos parecen depender de su adhesión a la membrana para agregarse y activar sus receptores. Al limitar la difusión a dos dimensiones, la adhesión a la membrana podría simplemente aumentar la probabilidad de colisiones ligando-ligando y promover así la dimerización, o una aglomeración de ligandos más extensa, entre ligandos que interactúan sólo débilmente en solución. Como alternativa, pueden existir mecanismos específicos para crear aglomeraciones de ligandos en la superficie celular. Además, los pares ligando-receptor se esperaría que se acumulasen en áreas de contacto entre las células que llevan ligandos y las células que llevan receptores.

45 Cualquiera o todos estos efectos de agregación lateral podrían contribuir a la multimerización y activación del receptor. La observación de que el receptor NUK expresado neuronalmente relacionado con EPH se concentra transitoriamente en áreas de contacto célula-célula [Henkemeyer, *et al.*, *Oncogene* 9: 1001-1014 (1994)], apoya la posibilidad de que las interacciones entre ligando unido a una membrana y receptor unido a otra membrana puedan promover la agregación lateral.

50 *Depósito de microorganismos*

Los siguientes microorganismos se han depositado en el "American Type Culture Collection", 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 según el Tratado de Budapest.

55 *Números de acceso*

pJFE14 que contiene *efl-2* 75728
 pJFE14 que contiene *efl-3* 75734
 pJFE14 que contiene *efl-4* 75921

60 La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria.

65

ES 2 192 199 T5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para potenciar la actividad biológica del dominio extracelular de un ligando de la familia de eph que comprende:
- a) expresar el dominio soluble del ligando con un marcaje epitópico;
- b) exponer el citado dominio soluble marcado ante anticuerpos anti-epítipo para formar un ligando aglomerado de la familia de eph,
- 10 en el que dicha actividad biológica se mide mediante fosforilación del dominio de tirosina quinasa de un receptor de la familia de eph.
- 15 2. Un método según la reivindicación 1, en el que el citado marcaje está en el extremo C del ligando.
3. Un método según la reivindicación 2, en el que el citado marcaje epitópico es c-myc o el dominio Fc de una IgC.
4. Un método para potenciar la actividad biológica del dominio soluble de un ligando de la familia de eph seleccionado de Efl-1 (B61), que comprende:
- 20 a) expresar el dominio soluble del ligando con el dominio Fc de IgG; y
- b) permitir que se formen dímeros de Fc,
- 25 en el que dicha actividad biológica se mide mediante fosforilación del dominio de tirosina quinasa de un receptor de la familia de eph.
5. Una preparación tratada con anticuerpo anti-epítipo de un ligando soluble aglomerado marcado epitópicamente de la familia de eph, que es obtenible mediante el método de la reivindicación 1, 2 ó 3, donde el ligando de la familia de eph es Efl-1 (B61).
- 30 6. Una preparación según la reivindicación 5, en la que el citado marcaje epitópico está en el extremo C del ligando.
7. Una preparación según la reivindicación 6, en la que el citado epítipo es myc o el dominio Fc de una IgC.
- 35 8. Un ligando soluble aglomerado biológicamente activo de la familia de eph que comprende (Efl soluble)_n, siendo el Efl soluble el dominio extracelular de Efl-1 (B61) y n es 2 o más,
- 40 en el que dicha actividad biológica se mide mediante fosforilación del dominio de tirosina quinasa de un receptor de la familia de eph.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Fig.1.

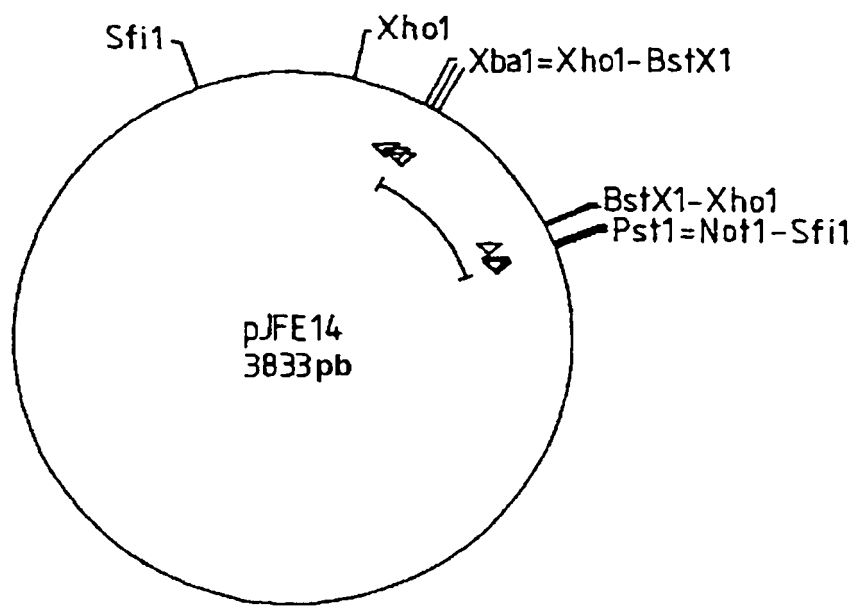


Fig.2.

B61	meflwapl	lgccslaaa	DRHTVFWNSS	NPKF-RNEDY	37	
EHK1-L	maaapl1111	llvpvpl1pl	laqppggalg	NRHAVVWNSS	NOHL-RREGY	49
ELK-L	marpgqrwlg	kwlvamvwa	lcrlatplaK	NLEEVWSSL	NPKFLSGKGL	50
Consenso			VWNSS	NPKF.R.EGY	50	
B61	TIHVQLNDYV	DIICPHYEDH	SV---ADAAM	EYTLYLVEH	EYYQLCPQS	84
EHK1-L	TVQVNVNDYL	DIICPHYNSS	GAGPGGGGA	EYLYLWVER	NGYRTCNA-S	98
ELK-L	VIYPKIGDKL	DIICPRAE--	-----AGRPY	EMVLYLVRP	EQAAACSTVL	93
Consenso	TI.V..NDYL	DIICPHYE..AG...	EY.LYV..	E.Y..C...S	100
B61	KDQVRWCNR	PEAKHGPEKL	SEKFORFTPF	TLGMEFKEGH	EYYYISK---	131
EHK1-L	OGFKRWCNR	PHAPHSPIKF	SEKFORYSAF	SLGMEFHAGH	EYYYIST---	145
ELK-L	DPNVLVTCNR	PEQE---IRF	TIKFOEFSFN	YMCLEFKKHH	EYYITSTSNQ	140
Consenso	...VRW.CNR	P.A.H.PIKF	SEKFORFSPP	.LG.EPK.GH	.YYYIST...	150
B61	PIHQEDR--	-C-IR-LRV	TV-SGKITHS	PQAHVNPQEK	RLAADDPEVR	174
EHK1-L	PTHNLHWK--	-C-IR-MKV	FVCCASTSHS	GEKPVPTLPQ	FTMGPNVKIN	189
ELK-L	SLEGLNREG	GVORTRTMKI	IMKVGQDPNA	VTPEQLTTSR	PSKEADNTVK	190
Consenso	P.H.LE.R..	..C-IR-MK				200
B61	VLHSIGHSAA	PRlfp1awtv	ll1pl111qtp			206
EHK1-L	VLEDFEGENP	QVPKLEKSIS	GTSPKREHlp	lavgiafflm	tflas	234
ELK-L	MATQAPGSRG	SLGSDGKHE	TVNQEEKSGP	GASGSSGDP	DGFFNSKval	237
ELK-L	faavgagcvi	flliiifltv	ll1KLRKRHR	KHTQORAAAL	SLSTLASPKG	297
ELK-L	GSGTAGTEPS	DIIIP1R1TTE	NNYCPHYEKV	SGDYGHVYI	VQEMPPQSPA	347
ELK-L	NIYYKV					353

Fig.3.

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE LA REGIÓN CODIFICADORA DE EHK-1L

GAC CTC GAG ATC CAT TGT GCT GGA AAG GCG GCG GCG GCT CCG GGG ATG GCG
GCG
GCT CCG CTG CTG CTG CTG CTG CTC GTG CCG GTG CCG CTG CTG CCG CTG CTG
GCC CAA GGG CCC GGA GGG GCG CTG GGA AAC CGG CAT GCG GTG TAC TGG AAC
AGC
TCC AAC CAG CAC CTG CGG CGA GAG GGC TAC ACC GTG CAG GTG AAC GTG AAC
GAC TAT CTG GAT ATT TAC TGC CCG CAC TAC AAC AGC TCG GGG GCG GGA CCG GGG
CCC GGA GGC GGG GCA GAG CAG TAC GTG CTG TAC ATG GTG AGC CGC AAC GGC
TAC CGC ACC TGC AAC GCC AGC CAG GGC TTC AAG CGC TGG GAG TGC AAC CGG
CCG
CAC GCC CCG CAC AGC CCC ATC AAG TTC TCG GAG AAG TTC CAG CGC TAC AGC GCC
TTC TCT CTG GGC TAC GAG TTC CAC GCC GGC CAC GAG TAC TAC TAC ATC TCC ACG
CCC ACT CAC AAC CTG CAC TGG AAG TGT CTG AGG ATG AAG GTG TTC GTC TGC
TGC GCC TCC ACA TCG CAC TCC GGG GAG AAG CCG GTC CCC ACT CTC CCC CAG TTC
ACC
ATG GGC CCC AAT GTG AAG ATC AAC GTG CTG GAA GAC TTT GAG GGA GAG AAC
CCT CAG GTG CCC AAG CTT GAG AAG AGC ATC AGC GGG ACC AGC CCC AAA CGG
GAA CAC CTG CCC CTG GCC GTG GGC ATC GCC TTC TTC CTC ATG ACG TTC TTG GCC
TCC
TAG CTC TGC CCC CTC CCC TGG GGG GGG AGA GAT GGG GCG GGG NTT GGA AGG
AGN
AGG GAG CCT TTG GCC TCT CCA AGG GAA GCC TAG TGG GCC TAG ACC CCT CCT
CCC ATG GTT AGA AGT GGG GCC TGN ACC ATA CAT CTG TGT CCG CCC CCT CTA CCC
CTT CCC CCC ANG TAG GGN ACT GTA GTG GAC CAA GCA CGG NGA CAG ACA TGG
NTC
CCG GGN GGG CTT GTG GCT CTG GTA ATG TNT GGC ACC AAA CTT GGG GGG CAA
AAA GGG GAG TGC TCA GGA CTC CCT GGN CCC TGG TAC TTT CCC TGA ATC TGG TGC
CTC TC

Fig.4A.

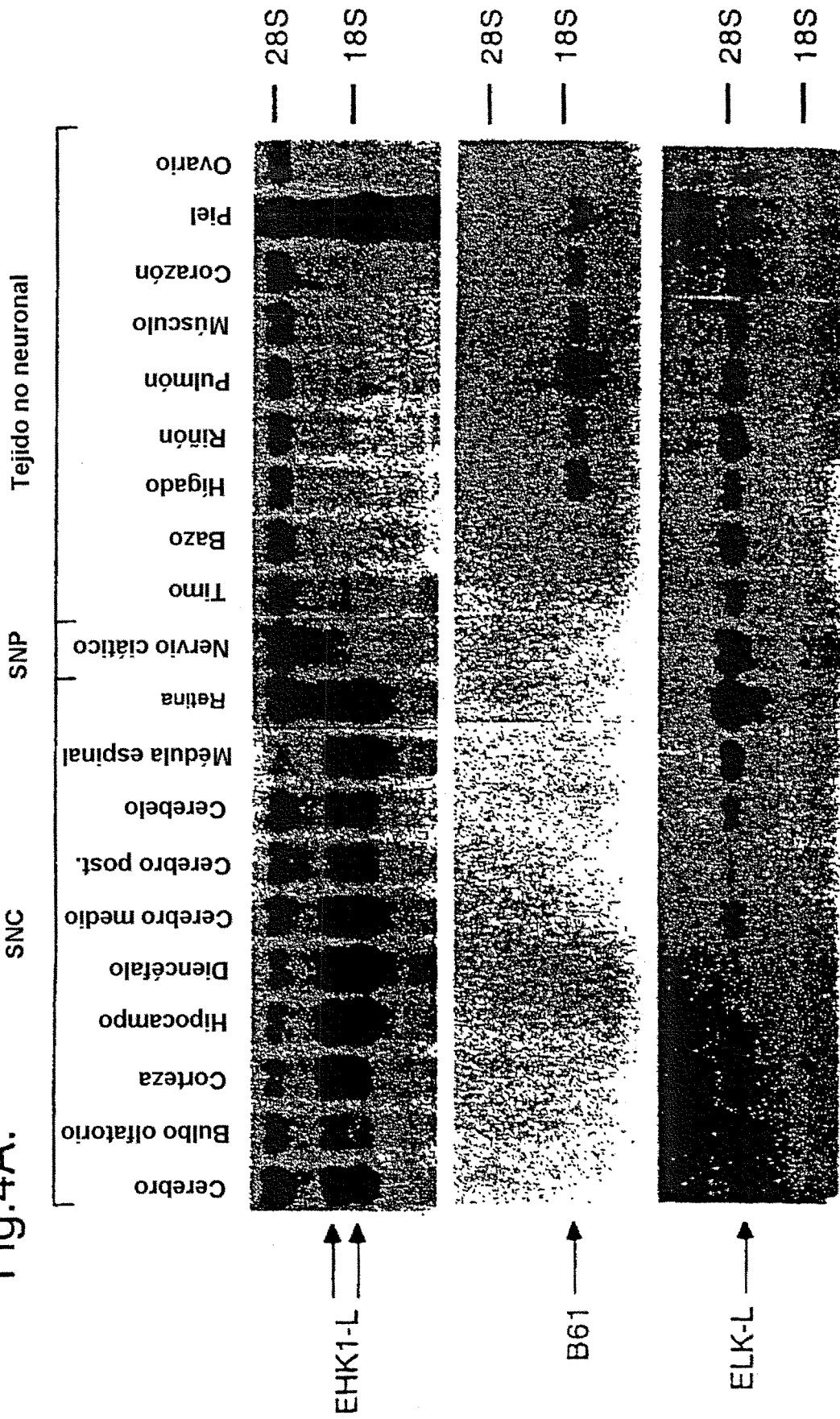


Fig.4B.

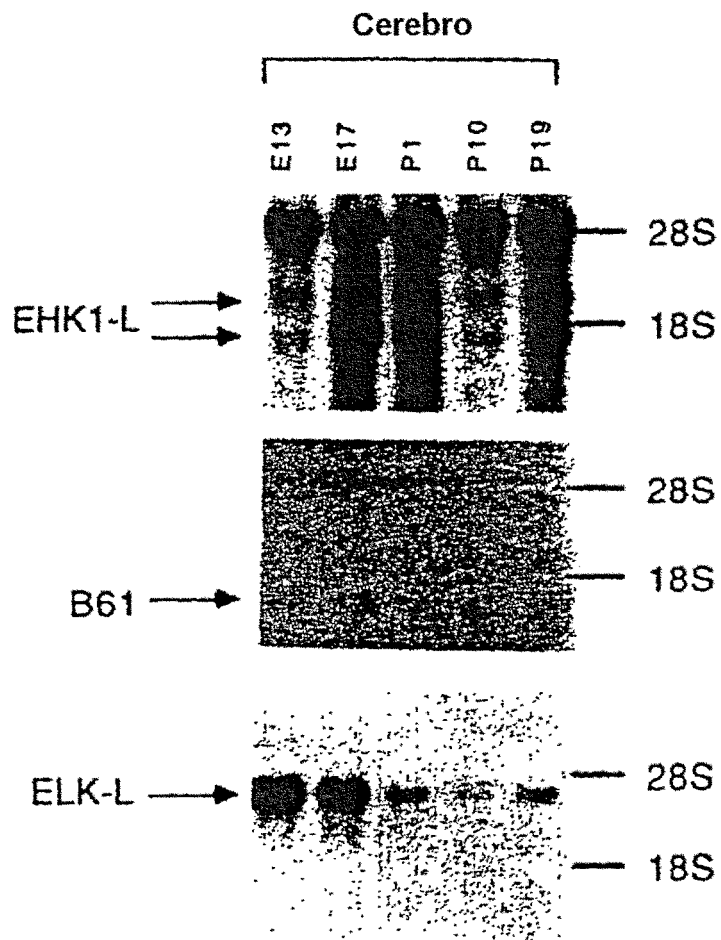


Fig.5.

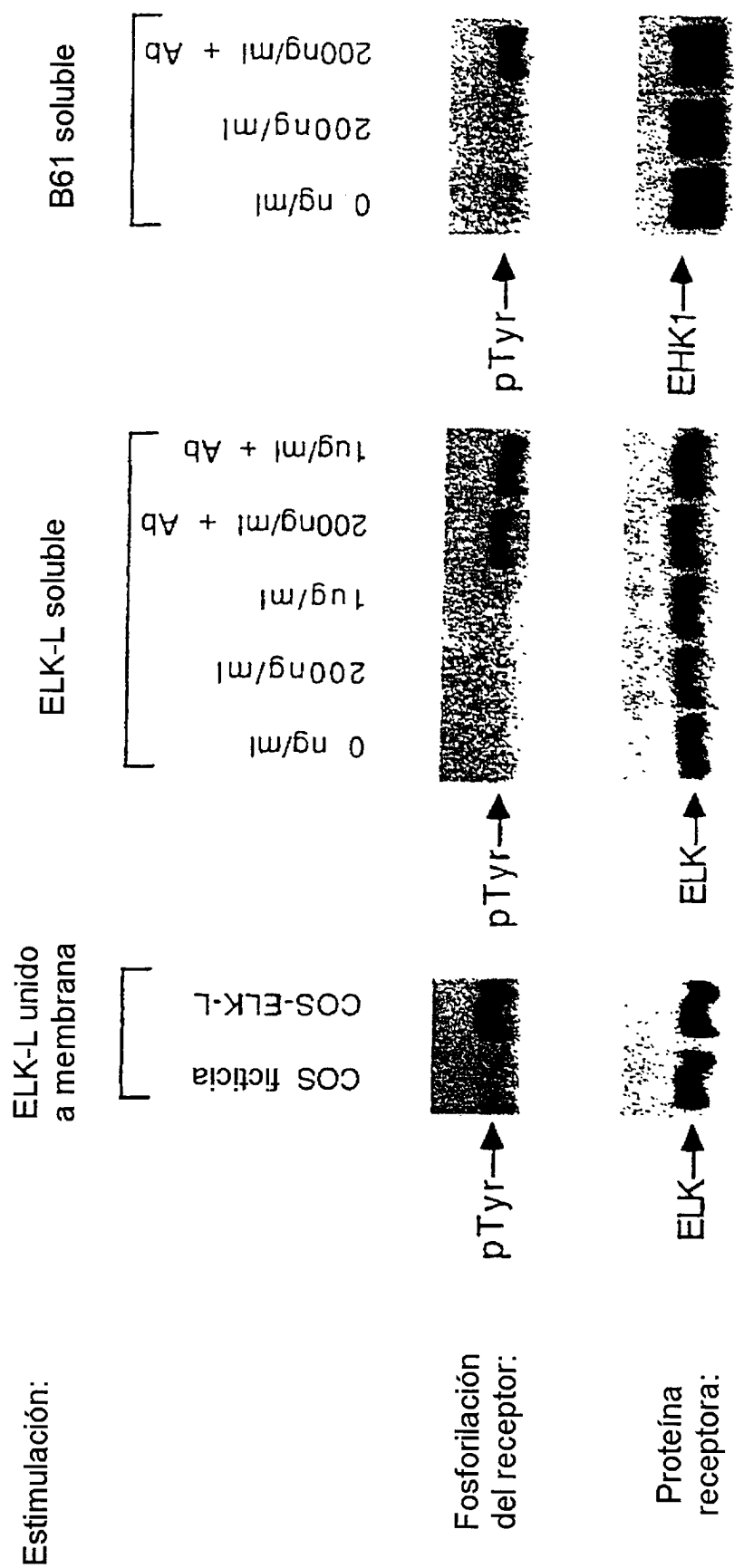


Fig.6.

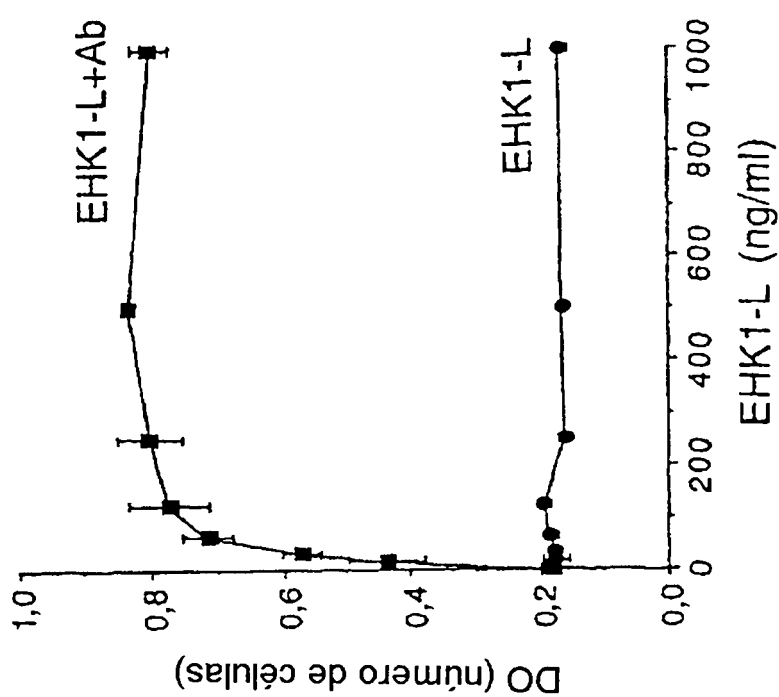
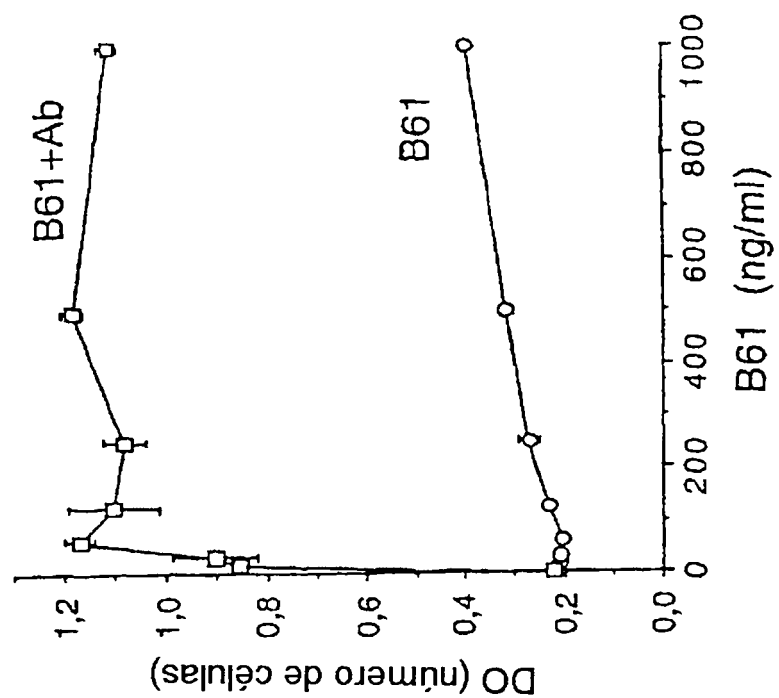
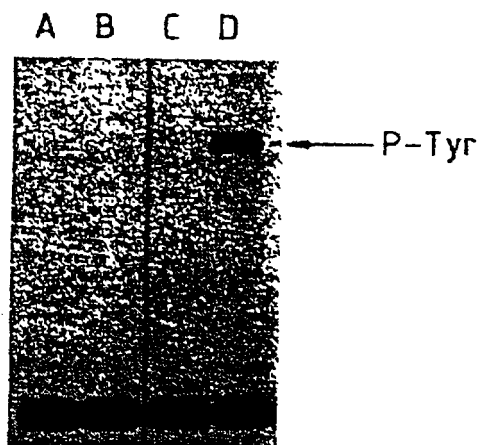


Fig.7.



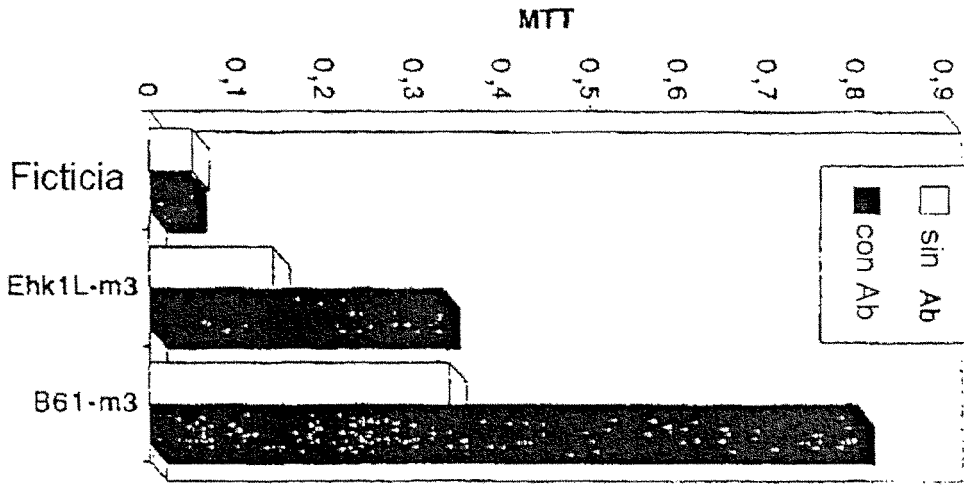


Fig.8.

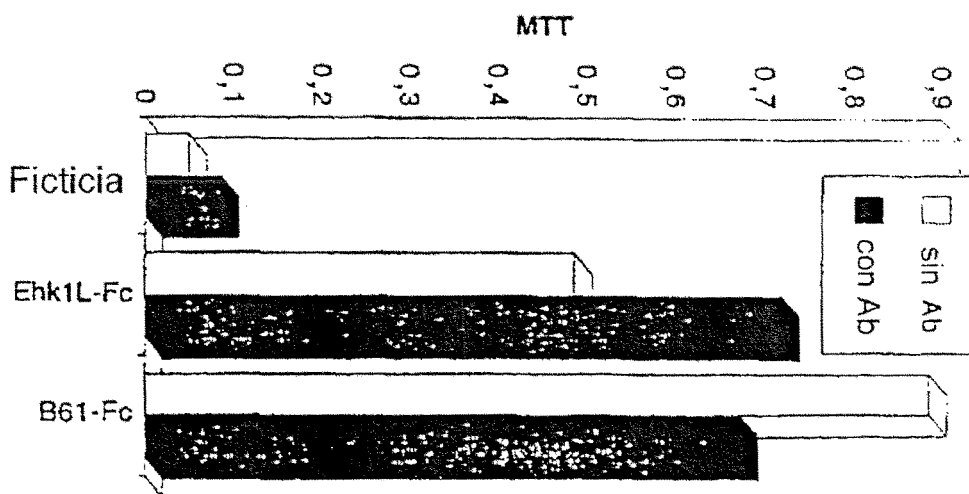


Fig.9.