



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 695**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03025430 .4**
96 Fecha de presentación : **22.10.1993**
97 Número de publicación de la solicitud: **1396542**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.03.2004**

54 Título: **Nueva proteína del ligando de la p-selectina.**

30 Prioridad: **23.10.1992 US 965662**
26.08.1993 US 112608

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.07.2011

73 Titular/es: **GENETICS INSTITUTE, L.L.C.**
87 Cambridge Park Drive
Cambridge, Massachusetts 02140, US

72 Inventor/es: **Larsen, Glenn R.;**
Sako, Dianne S.;
Chang, Xiao-Jia y
Veldman, Geertruida M.

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 362 695 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).

DESCRIPCION

Nueva proteína ligando de p-selectina

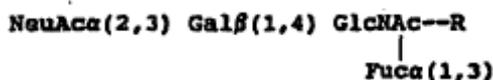
ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al campo de sustancias antiinflamatorias que actúan inhibiendo la adhesión de leucocitos a células endoteliales. Más particularmente, la presente invención se refiere a un nuevo ligando para la proteína de adhesión de mamíferos conocida como "P-selectina".

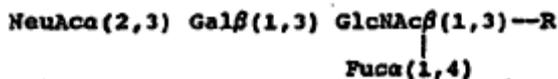
10 Durante la inflamación, los leucocitos se adhieren al endotelio vascular y entran en el tejido subendotelial, una interacción que está mediada por una unión específica de la selectina o de la clase LEC-CAM de proteínas a ligandos en células diana. Dicha adhesión celular mediada por selectina también se produce en trastornos trombóticos y enfermedades parasitarias, y puede estar implicada en la propagación metastásica de células tumorales.

15 Las proteínas selectinas se caracterizan por un dominio tipo lectina N-terminal, un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico y regiones de homología con proteínas de unión complementarias. Hasta ahora se han identificado tres proteínas selectina humanas, E-selectina (antiguamente ELAM-1), L-selectina (antiguamente LAM-1) y P-selectina (antiguamente PADGEM o GMP-140). La E-selectina se induce en células endoteliales varias horas después de la activación por citocinas, mediando la interacción dependiente de calcio entre neutrófilos y el endotelio. La L-selectina es el receptor de direccionamiento (*homing*) de linfocitos y la P-selectina aparece rápidamente en la superficie celular de las plaquetas cuando se activan, mediando la adhesión dependiente de calcio de neutrófilos o monocitos a plaquetas. La P-selectina también se encuentra en los cuerpos de Weibel-Palade de células endoteliales; tras su liberación de estas vesículas la P-selectina media la unión temprana de neutrófilos al endotelio estimulado con histamina o trombina.

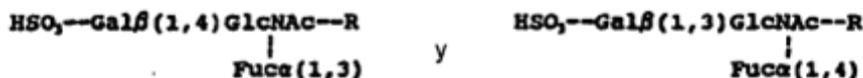
20 Se cree que las selectinas median la adhesión a través de interacciones específicas con ligandos presentes en la superficie de células diana. Generalmente, los ligandos de selectinas están compuestos al menos en parte por un resto carbohidrato. Por ejemplo, la E-selectina se une a carbohidratos que tienen la estructura terminal



y también a carbohidratos que tienen la estructura terminal



25 donde R es el resto de la cadena de carbohidrato. Estos carbohidratos son antígenos de grupo sanguíneo conocidos y se denominan comúnmente Lewis^x sialilado y Lewis^a sialilado, respectivamente. La presencia del antígeno Lewis^x sialilado solo en la superficie de una célula endotelial puede ser suficiente para promover la unión a una célula que exprese E-selectina. La E-selectina también se une a carbohidratos que tienen las estructuras terminales



30 Como con la E-selectina, cada selectina parece unirse a una variedad de carbohidratos con afinidades variables. La intensidad del acontecimiento adhesivo mediado por selectina (afinidad de unión) también puede depender de la densidad del carbohidrato y de la densidad de la selectina en la superficie celular.

35 La P-selectina se une a carbohidratos que contienen la forma no sialilada del antígeno de grupo sanguíneo Lewis^x y con mayor afinidad a Lewis^x sialilado. La P-selectina también puede reconocer sulfatidas, que son galactosil ceramidas 3-sulfatadas heterogéneas, aisladas de células mieloides y tumorales por extracción de lípidos. Sin embargo, la unión de células que llevan P-selectina a células que llevan ligandos de P-selectina se suprime cuando las células que llevan ligandos se tratan con proteasas, indicando que el ligando de P-selectina puede ser una glicoproteína.

40 Se han identificado recientemente dos supuestos ligandos de glicoproteína para la P-selectina, uno de los cuales se ha purificado parcialmente, (Moore et al., J. Cell Biol. 118, 445-456 (1992)). Sin embargo, no se describe la composición de aminoácidos ni la secuencia aminoácidos de estas glicoproteínas.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

45 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una proteína ligando de P-selectina que es un fragmento de la proteína ligando de P-selectina que tiene actividad de ligando de P-selectina, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

a) del aminoácido 21 al aminoácido 54 de la SEC ID N°: 1;

- b) del aminoácido 55 al aminoácido 127 de la SEC ID Nº: 1;
- c) del aminoácido 128 al aminoácido 267 de la SEC ID Nº: 1;
- d) del aminoácido 268 al aminoácido 308 de la SEC ID Nº: 1;
- e) del aminoácido 309 al aminoácido 333 de la SEC ID Nº: 1;
- 5 f) del aminoácido 334 al aminoácido 402 de la SEC ID Nº: 1;
- g) del aminoácido 43 al aminoácido 56 de la SEC ID Nº: 1;
- h) del aminoácido 1 al aminoácido 310 de la SEC ID Nº: 1.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica uno de los fragmentos de ligando de P-selectina de la invención.

- 10 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo que reacciona específicamente con un ligando de P-selectina, en el que la secuencia de la proteína ligando de P-selectina consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- a) del aminoácido 42 al aminoácido 56 de la SEC ID Nº: 1; y
- b) del aminoácido 127 al aminoácido 138 de la SEC ID Nº: 1.

- 15 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un plásmido que codifica un ligando de P-selectina que comprende una secuencia de acuerdo con la SEC ID Nº: 1.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo de la invención que reacciona específicamente con la proteína ligando de P-selectina para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una afección caracterizada por una adhesión mediada por P-selectina.

- 20 Asimismo, la presente invención se refiere a un anticuerpo de la invención que reacciona específicamente con una proteína ligando de P-selectina para su uso para el tratamiento o diagnóstico de enfermedades inflamatorias o cáncer.

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo de la invención que reacciona específicamente con una proteína ligando de P-selectina para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o diagnosticar enfermedades inflamatorias o cáncer.

- 25 En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende:

- a) una primera secuencia de aminoácidos seleccionada de: del aminoácido 21 al aminoácido 54 de la SEC ID Nº: 1; del aminoácido 55 al aminoácido 127 de la SEC ID Nº: 1; del aminoácido 128 al aminoácido 267 de la SEC ID Nº: 1; del aminoácido 268 al aminoácido 308 de la SEC ID Nº: 1; del aminoácido 309 al aminoácido 333 de la SEC ID Nº: 1; del aminoácido 334 al aminoácido 402 de la SEC ID Nº: 1; del aminoácido 43 al aminoácido 56 de la SEC ID Nº: 1; y del aminoácido 42 al aminoácido 295 de la SEC ID Nº: 1; y

- 30

- b) una segunda secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de una porción Fc de una inmunoglobulina.

En un octavo aspecto, la presente invención se refiere a un ADN que codifica la proteína de fusión de la invención.

En un noveno aspecto, la presente invención se refiere al plásmido que comprende un ADN que codifica una proteína de fusión soluble del ligando de P-selectina-Fc.

35 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Los presentes inventores han identificado y aislado por primera vez un nuevo ácido nucleico y que comprende una secuencia que codifica una proteína que actúa como ligando para P-selectina en células endoteliales humanas y plaquetas. La secuencia de aminoácidos completa de la proteína ligando de P-selectina (es decir, el péptido maduro más la secuencia líder) se caracteriza por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID Nº: 1 del aminoácido 1 al aminoácido 402. El análisis de hidrofobicidad y la comparación con patrones de escisión conocidos predicen una secuencia señal de 20 a 22 aminoácidos, es decir, aminoácidos 1 a 20 o aminoácidos 1 a 22 de la SEC ID Nº: 1. La proteína ligando de P-selectina contiene un sitio de escisión PACE (enzima convertora de aminoácidos básicos emparejados) (-Arg-Asp-Arg-Arg-) en los aminoácidos 38-41 de la SEC ID Nº: 1. La proteína ligando de P-selectina madura está caracterizada por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID Nº: 1 del aminoácido 42 al aminoácido 402. Una forma soluble de la proteína ligando de P-selectina se caracteriza por contener los aminoácidos 21 a 310 de la SEC ID Nº: 1. Otra forma soluble de la proteína ligando de P-selectina madura está caracterizada por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID Nº: 1 del aminoácido 42 al aminoácido 310. La forma soluble de la proteína ligando de P-selectina se caracteriza adicionalmente por ser soluble en solución acuosa a temperatura ambiente. Por supuesto, las secuencias de ADN correspondientes como se expone en la SEC ID Nº: 1 que codifican estas proteínas se incluyen también en la presente invención.

50

glicosilación postraduccional, como se describe en detalle en el Ejemplo 6(C). Por lo tanto, se cree que las cadenas de oligosacáridos tanto ligadas a N como ligadas a O, al menos algunas de las cuales están sialiladas, están presentes en la proteína ligando de P-selectina de la invención.

5 La proteína ligando de P-selectina de la invención también puede unirse a E-selectina. El medio acondicionado de células COS que se han cotransfectado con el ADN que codifica sPSL.T7 y con el ADN que codifica la 3/4FT, cuando se usa para recubrir pocillos de placas de microtitulación de plástico, causa que las células CHO que expresan E-selectina se unan a las placas; sin embargo, las células CHO que no expresan E-selectina no se unen a dichas placas. La unión de células CHO que expresan E-selectina a placas de microtitulación recubiertas con medio acondicionado de células COS que se han cotransfectado con el ADN que codifica sPSL.T7 y con el ADN que codifica 3/4FT se suprime en presencia de EDTA o de un anticuerpo neutralizante específico para E-selectina. El medio acondicionado de células COS transfectadas solamente con el ADN de sPSL.T7 no causa la unión de células COS que expresan E-selectina cuando se recubre sobre pocillos de placas de microtitulación. Por estas razones, se cree que la proteína ligando de P-selectina de la invención es útil como inhibidor de la adhesión intercelular mediada por E-selectina además de la adhesión intercelular mediada por P-selectina.

15 Los fragmentos de la proteína ligando de P-selectina que son capaces de interactuar con P-selectina o que son capaces de inhibir la adhesión intercelular mediada por P-selectina son el objeto de la presente invención. Dichos fragmentos comprenden los aminoácidos 21 a 54 de la SEC ID N°: 1, una región de la proteína ligando de P-selectina que tiene una baja frecuencia de restos serina y treonina; los aminoácidos 55 a 127 de la SEC ID N°: 1, que tienen una alta frecuencia de prolina, serina y treonina además de las dos secuencias de consenso para glicosilación ligada a asparagina (Asn-X-Ser/Thr); otro fragmento de mayor tamaño, los aminoácidos 128 a 267 de la SEC ID N°: 1, que tanto tienen una alta frecuencia de prolina, serina y treonina como contienen quince repeticiones de la secuencia de consenso de diez aminoácidos siguiente: Ala-(Thr/Met)-Glu-Ala-Gln-Thr-Thr-(Pro/Arg/Gln/Ala/Glu)-(Leu/Pro)-(Ala/Thr) (fragmentos de menor tamaño dentro de este fragmento de gran tamaño también pueden conservar la capacidad de interactuar con P-selectina o actuar como inhibidores de la adhesión intercelular mediada por P-selectina); la región que contiene una secuencia de consenso para glicosilación ligada a asparagina y que comprende los aminoácidos 268 a 308 de la SEC ID N°: 1; la región hidrófoba de la proteína representada por los aminoácidos 309 a 333 de la SEC ID N°: 1; la región anfífila de la proteína ligando de P-selectina de los aminoácidos 334 a 402. Los fragmentos adicionales pueden comprender del aminoácido 43 al aminoácido 56 de la SEC ID N°: 1, con una o más tirosinas sulfatadas en el aminoácido 46, aminoácido 48 y/o aminoácido 51. Los fragmentos de la proteína ligando de P-selectina pueden estar en forma lineal o pueden ciclarse usando métodos conocidos, por ejemplo, como se describe en H. U. Saragovi, et al., *Bio/Technology* 10, 773-778 (1992) y en R. S. McDowell, et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114, 9245-9253 (1992). Para los fines de la presente invención, todas las referencias a "proteína ligando de P-selectina" en la presente memoria incluyen fragmentos capaces de unirse a P-selectina. Estos fragmentos son el objeto de la invención.

35 Dichos fragmentos pueden fusionarse con moléculas transportadoras tales como inmunoglobulinas, para aumentar la valencia de ligando de P-selectina de sitios de unión. Por ejemplo, formas solubles de la proteína ligando de P-selectina tales como el fragmento del aminoácido 42 al aminoácido 295 de la SEC ID N°: 1 pueden fusionarse a través de secuencias "enlazadoras" con la porción Fc de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la proteína ligando de P-selectina, una fusión de este tipo podría ser con la porción Fc de una molécula de IgG como en el Ejemplo 5(D) y en la SEC ID N°: 6. También pueden usarse otros isotipos de inmunoglobulina para generar dichas fusiones. Por ejemplo, una fusión de proteína ligando de P-selectina-IgM generaría una forma decavalente de la proteína ligando de P-selectina de la invención.

45 Como se detalla en los Ejemplos a continuación, la proteína ligando de P-selectina se obtuvo inicialmente usando una estrategia de clonación y expresión (Clark et al. U.S. 4.675.285). Se construyó una genoteca de ADNc a partir de la línea celular promielocítica humana HL60 (S. J. Collins, et al., *Nature* 270, 347-349 (1977), ATCC N° CCL 240). Esta genoteca se cotransfectó en células COS con un ADN que codifica una 3/4FT y los cotransfectantes se exploraron para determinar su unión a una molécula quimérica que consistía en la porción extracelular de P-selectina y la porción Fc de un anticuerpo monoclonal IgG γ 1 humano. Los cotransfectantes que se unían a la P-selectina quimérica se enriquecieron para ADNc que codifican la proteína ligando de P-selectina. Este procedimiento de exploración se repitió varias veces para enriquecer la población de plásmidos adicionalmente para ADNc que codifican la proteína ligando de P-selectina. En una segunda fase de clonación, la población de plásmidos enriquecida se cotransfectó de nuevo en células COS con el gen de 3/4FT y se exploró para determinar su unión a una línea celular CHO marcada fluorescentemente que expresaba P-selectina en la superficie celular. Se obtuvo un solo clon de ADNc a partir de esta estrategia y se denominó pMT21:PL85. El plásmido pMT21:PL85 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo el 16 de octubre de 1992 y se le dio el número de acceso ATCC 69096.

55 Se expone un nuevo ADN en la SEC ID N°: 1. Este ADN puede codificar una diversidad de formas de la proteína ligando de P-selectina. Por ejemplo, codifica la proteína ligando de P-selectina completa, que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 1 del aminoácido 1 al aminoácido 402. En otra realización, codifica una forma de la proteína ligando de P-selectina que carece de la secuencia señal que está caracterizada por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 1 del aminoácido 21 al aminoácido 402. También codifica la proteína ligando de P-selectina madura caracterizada por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 1 del aminoácido 42 al aminoácido 402. Este ADN también se incorpora en una secuencia de ADN que codifica una forma soluble de la proteína ligando de P-selectina madura, estando dicha proteína caracterizada por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 1

del aminoácido 42 al aminoácido 310. Este ADN se incorpora además en una secuencia de ADN que codifica una forma soluble de la proteína ligando de P-selectina que carece de la secuencia señal, estando dicha proteína caracterizada por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 1 del aminoácido 21 al aminoácido 310. En una realización, la presente invención codifica una forma soluble de la proteína ligando de P-selectina caracterizada por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 1 del aminoácido 1 al aminoácido 310. El ADN de la presente invención está libre de asociaciones con otros ADN humanos y, por lo tanto, se caracteriza como un ADN aislado. Como se ha detallado anteriormente, los ADN que codifican fragmentos de ligando de P-selectina que interacción con P-selectina son el objeto de la presente invención.

La expresión de los transcritos de ARNm de proteína ligando de P-selectina se ha observado en una diversidad de líneas celulares humanas (HL-60, THP-1, U937) y en monocitos y leucocitos polimorfonucleares humanos por análisis de Northern usando una sonda de ADNc de proteína ligando de P-selectina. En todas estas líneas celulares, se observó un transcrito principal de 2,5 kb. Se observó una especie minoritaria de aproximadamente 4 kb en las líneas celulares HL60 y U937 y en leucocitos polimorfonucleares. Por el contrario, no se detectó expresión de ARNm de ligando de P-selectina en la línea celular de hepatoblastoma humano HepG2.

La proteína ligando de P-selectina mencionada en la presente memoria está codificada por un gen de una sola copia y no es parte de una familia de múltiples genes, según se determinó por análisis de transferencia de Southern. La forma genómica de la proteína ligando de P-selectina contiene un intrón grande de aproximadamente 9 kb localizado en el nucleótido 54 en la región no traducida 5'. En monocitos y leucocitos polimorfonucleares, la proteína ligando de P-selectina está codificada por la secuencia de ADN expuesta en la SEC ID N°: 3 y contiene dieciséis regiones de repetición.

Para los fines de la presente invención, todas las referencias en la presente memoria al "ADN de SEC ID N°: 1" incluyen, además de la secuencia de ADN específica expuesta en la SEC ID N°: 1, secuencias de ADN que codifican la proteína ligando de P-selectina madura de la SEC ID N°: 1; secuencias de ADN que codifican fragmentos de la proteína ligando de P-selectina de la SEC ID N°: 1 que son capaces de unirse a P-selectina; secuencias de ADN que codifican formas solubles de la proteína ligando de P-selectina de SEC ID N°: 1; variaciones alélicas de la secuencia de ADN de SEC ID N°: 1; ADN que hibridan con la secuencia de ADN de SEC ID N°: 1 y que codifican proteínas que tienen actividad de proteína ligando de P-selectina; ADN que difieren del ADN de la SEC ID N°: 1 en virtud de la degeneración del código genético; y las variaciones de la secuencia de ADN de la SEC ID N°: 1 expuestas anteriormente. De forma similar, todas las referencias al "ADN de SEC ID N°: 3" incluyen además de la secuencia de ADN específica expuesta en la SEC ID N°: 3 secuencias de ADN que codifican la proteína ligando de P-selectina madura de la SEC ID N°: 3; secuencias de ADN que codifican fragmentos de la proteína ligando de P-selectina de SEC ID N°: 3 que son capaces de unirse a P-selectina; secuencias de ADN que codifican formas solubles de la proteína ligando de P-selectina de SEC ID N°: 3; variaciones alélicas de la secuencia de ADN de SEC ID N°: 3; ADN que hibridan con la secuencia de ADN de SEC ID N°: 3 y que codifican proteínas que tienen actividad de proteína ligando de P-selectina; ADN que difieren del ADN de la SEC ID N°: 3 en virtud de la degeneración del código genético; y las variaciones de la secuencia de ADN de SEC ID N°: 3 expuestas anteriormente.

Un ADN que codifica una forma soluble de la proteína ligando de P-selectina puede prepararse por expresión de un ADN modificado en el que se delecionan las regiones que codifican los dominios citoplasmáticos y transmembrana de la proteína ligando de P-selectina y/o se introduce un codón de terminación 3' al codón para el aminoácido en el extremo carboxi-terminal del dominio extracelular. Por ejemplo, el análisis de hidrofobicidad predice que la proteína ligando de P-selectina expuesta en la SEC ID N°: 1 tiene un dominio transmembrana compuesto por los aminoácidos 311 a 332 de la SEC ID N°: 1 y un dominio citoplasmático compuesto por los aminoácidos 333 a 402 de la SEC ID N°: 1. Puede generarse un ADN modificado como se ha descrito anteriormente por técnicas de biología molecular convencionales, incluyendo métodos de mutagénesis dirigida que se conocen en la técnica o por la reacción en cadena de la polimerasa, usando cebadores oligonucleotídicos apropiados. Los métodos para producir varios ADN que codifican diversas proteínas ligando de P-selectina solubles se exponen en el Ejemplo 5.

El ADN aislado descrito en la presente memoria puede unirse operativamente a una secuencia de control de la expresión, tal como los vectores de expresión pMT2 o pED descritos en Kaufman et al., *Nucleic Acids Res.* 19, 4485-4490 (1991), para producir el ligando de P-selectina de forma recombinante. Se conocen en la técnica muchas secuencias de control de la expresión adecuadas. También se conocen métodos generales de expresión de proteínas recombinantes y se ejemplifican en R. Kaufman, *Methods in Enzymology* 185, 537-566 (1990). Como se define en la presente memoria, la expresión "unido operativamente" significa enzimáticamente o químicamente ligado para formar un enlace covalente entre el ADN aislado de la invención y la secuencia de control de la expresión, de tal modo que la proteína ligando de P-selectina se expresa por una célula hospedadora que se ha transformado (transfectado) con el ADN/secuencia de control de la expresión ligados.

Se conocen varias enzimas endoproteolíticas que escinden péptidos precursores en el lado carboxilo de secuencias de aminoácidos emparejados (por ejemplo, -Lys-Arg- y -Arg-Arg-) para dar proteínas maduras. Dichas enzimas se conocen generalmente como enzimas conversoras de aminoácidos básicos emparejados o PACE, y su uso en la producción recombinante de péptidos maduros se describe ampliamente en el documento WO 92/09698 y en la solicitud U.S. de N° de Serie 07/885.972. Se sabe que la familia de enzimas PACE aumenta la eficacia del procesamiento proteolítico de polipéptidos precursores en células hospedadoras recombinantes. Como se ha mencionado anteriormente, los fragmentos de la proteína ligando de P-selectina de la invención contienen dicho sitio de escisión de PACE.

La proteína ligando de P-selectina madura de la presente invención puede generarse por una célula hospedadora que contiene una secuencia de ADN que codifica cualquier proteína ligando de P-selectina soluble como se describe en la presente memoria y una secuencia de ADN que codifica PACE, como se describe en el documento WO 92/09698 y en la solicitud U.S. de N° Serie 07/885.972, o usando la secuencia de ADN de la SEC ID N°: 5. Dicha célula hospedadora puede contener los ADN como resultado de la cotransformación o transformación secuencial de vectores de expresión separados que contienen el ADN de proteína ligando de P-selectina soluble y el ADN de PACE, respectivamente. Un tercer ADN que codifica una 3/4FT también puede cotransformarse con los ADN que codifican la proteína ligando de P-selectina y PACE. Como alternativa, la célula hospedadora puede contener los ADN como resultado de la transformación de un solo vector de expresión que contiene tanto ADN de proteína ligando de P-selectina soluble como ADN de PACE. La construcción de dichos vectores de expresión se incluye en el nivel de especialidad en biología molecular. También se conocen métodos para cotransformación y transformación.

Se conocen muchas secuencias de ADN que codifican PACE. Por ejemplo, se describe un ADN que codifica una forma de PACE, conocida como furina, en A. M. W. van den Ouweland et al., Nucl. Acids Res. 18, 664 (1990). Se expone un ADNc que codifica una forma soluble de PACE, conocida como PACESOL en la SEC ID N°: 5. También existen ADN que codifican otras formas de PACE y cualquiera de dichos ADN que codifican PACE puede usarse para producir la proteína ligando de P-selectina madura soluble de la invención, siempre que el PACE sea capaz de escindir la proteína ligando de P-selectina en los aminoácidos 38-41. Preferentemente, se usa un ADN que codifica una forma soluble de PACE para producir la proteína ligando de P-selectina madura soluble de la presente invención.

Los ADN que codifican una forma soluble de la proteína ligando de P-selectina y PACE, por separado o en conjunto, pueden unirse operativamente a una secuencia de control de la expresión tal como las contenidas en los vectores de expresión pMT2 o pED analizados anteriormente, para producir el ligando de P-selectina soluble escindido por PACE de forma recombinante. Se conocen en la técnica secuencias de control de la expresión adecuadas adicionales. Los ejemplos 3(C) y 3(D) a continuación exponen métodos para producir la proteína ligando de P-selectina madura soluble de la invención.

Varios tipos de células pueden actuar como células hospedadoras adecuadas para la expresión de la proteína ligando de P-selectina. Las células hospedadoras adecuadas son capaces de unirse a cadenas laterales de carbohidratos características de proteína ligando de P-selectina funcional. Dicha capacidad puede surgir en virtud de la presencia de una enzima de glicosilación adecuada dentro de la célula hospedadora, ya sea de origen natural, inducida por mutagénesis química o por transfección de la célula hospedadora con un plásmido de expresión adecuado que contiene una secuencia de ADN que codifica la enzima de glicosilación. Las células hospedadoras incluyen, por ejemplo, células COS de mono, células de ovario de hámster chino (CHO), células 293 de riñón humano, células A431 epidérmicas humanas, células Colo205 humanas, células 3T3, células CV-1, otras líneas celulares de primate transformadas, células diploides normales, cepas de células obtenidas de cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, células HELA, células L de ratón, BHK, HL-60, U937 o Hak.

La proteína ligando de P-selectina también puede producirse uniéndose operativamente el ADN aislado de la invención y uno o más ADN que codifican enzimas de glicosilación adecuadas a secuencias de control adecuadas en uno o más vectores de expresión de insecto y empleando un sistema de expresión de insecto. Están disponibles en el mercado materiales y métodos para sistemas de expresión de baculovirus/células de insecto en forma de kit en, por ejemplo, Invitrogen, San Diego, California, Estados Unidos (el kit MaxBace) y dichos métodos son bien conocidos en la técnica, como se describe en Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin N° 1555 (1987). También pueden producirse formas solubles de la proteína ligando de P-selectina en células de insecto usando ADN aislados apropiados como se ha descrito anteriormente. Un ADN que codifica una forma de PACE puede coexpresarse adicionalmente en una célula hospedadora de insecto para producir una forma escindida por PACE de la proteína ligando de P-selectina.

Como alternativa, puede ser posible producir la proteína ligando de P-selectina en eucariotas inferiores tales como levaduras o en procariotas tales como bacterias. Las cepas de levadura potencialmente adecuadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces*, *Candida* o cualquier cepa de levadura capaz de expresar proteínas heterólogas. Las cepas bacterianas potencialmente adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar proteínas heterólogas. Si la proteína ligando de P-selectina se genera en levaduras o bacterias, es necesario unir los carbohidratos apropiados a los sitios apropiados en el resto proteico covalentemente para obtener la proteína ligando de P-selectina glicosilada. Dichas uniones covalentes pueden lograrse usando métodos químicos o enzimáticos conocidos.

Los fragmentos de la proteína ligando de P-selectina de la invención también pueden expresarse como un producto de animales transgénicos, por ejemplo, como un componente de la leche de vacas, cabras, cerdos u ovejas transgénicas que se caracteriza por células germinales o somáticas que contienen una secuencia de ADN que codifica la proteína ligando de P-selectina.

Los fragmentos de la proteína ligando de P-selectina de la invención pueden prepararse cultivando células hospedadoras transformadas en condiciones de cultivo necesarias para expresar una glicoproteína de unión a P-selectina. La glicoproteína expresada resultante puede purificarse entonces a partir del medio de cultivo o de extractos celulares. Las formas solubles de la proteína ligando de P-selectina de la invención pueden purificarse por cromatografía de afinidad sobre Lentil lectin-Sepharose® y posterior elución con α -metil-manósido 0,5 M. La proteína ligando de P-selectina soluble eluida puede purificarse después adicionalmente y concentrarse mediante una etapa de

5 precipitación con sulfato de amonio al 0,70%. Después, la proteína se recupera, se resuspende y se purifica adicionalmente por cromatografía de exclusión por tamaño sobre un TSK G4000SW_{XL}. Como alternativa, pueden purificarse formas de longitud completa de la proteína ligando de P-selectina de la invención por preparación de una fracción de membrana total a partir de la célula de expresión y extracción de las membranas con un detergente no iónico tal como Triton X-100. El extracto de detergente puede pasarse después sobre una columna de afinidad compuesta por P-selectina inmovilizada y la proteína ligando de P-selectina puede eluirse de la columna con EDTA 10 mM en un tampón que contiene detergente al 0,1%. El material eluido de la columna de afinidad puede dializarse después para eliminar EDTA y purificarse adicionalmente sobre una columna de afinidad de Lentil lectin-Sepharose®, eluyendo de nuevo con α -metil-manósido 0,5 M.

10 Como alternativa, los fragmentos de la proteína ligando de P-selectina de la invención se concentran usando un filtro de concentración de proteína disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación tal como un medio de filtración en gel. Como alternativa, puede emplearse una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o substrato que tiene grupos dietilaminoetil (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. Como alternativa, puede emplearse una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores de cationes adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren grupos sulfopropilo (por ejemplo, columnas de S-Sepharose®). La purificación de la proteína ligando de P-selectina a partir de sobrenadante de cultivo también puede incluir una o más etapas de columna sobre dichas resinas de afinidad como concanavalina A-agarosa, heparinatoyopearl® o Cibacrom blue 3GA Sepharose®; o por cromatografía de interacción hidrófoba usando resinas tales como éter fenílico, éter butílico o éter propílico; o por cromatografía de inmunofinidad.

20 Por último, pueden emplearse una o más etapas de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) que emplean medios de RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo colgantes u otros grupos alifáticos, para purificar adicionalmente la proteína ligando de P-selectina. También pueden emplearse algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una proteína recombinante aislada sustancialmente homogénea. La proteína ligando de P-selectina purificada de este modo está sustancialmente libre de otras proteínas de mamífero y se define de acuerdo con la presente invención como "proteína ligando de P-selectina aislada".

30 La proteína ligando de P-selectina aislada puede ser útil en el tratamiento de afecciones caracterizadas por una adhesión intercelular mediada por P-selectina. Dichas afecciones incluyen, sin limitación, infarto de miocardio, infección vírica o bacteriana, afecciones metastásicas, trastornos inflamatorios tales como artritis, síndrome de dificultad respiratoria aguda, asma, enfisema, reacción de hipersensibilidad de tipo retardado, lupus eritematoso sistémico, lesión térmica tal como quemaduras o congelaciones, tiroiditis autoinmune, encefalomiелitis alérgica experimental, esclerosis múltiple, síndrome de lesión multiorgánica secundario a traumatismo, diabetes, síndrome de Reynaud, dermatosis neutrofílica (síndrome de Sweet), enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Grave, glomerulonefritis, gingivitis, periodontitis, síndrome urémico hemolítico, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enterocolitis necrotizante, síndrome asociado a transfusión de granulocitos, toxicidad inducida por citocinas y similares. La proteína ligando de P-selectina aislada también puede ser útil en el trasplante de órganos, tanto para preparar órganos para el trasplante como para sofocar el rechazo de un trasplante de órganos. La proteína ligando de P-selectina aislada puede usarse para tratar pacientes con hemodiálisis y leucoforesis. Además, la proteína ligando de P-selectina aislada puede usarse como agente antimetastásico. La proteína ligando de P-selectina aislada puede usarse por sí misma como un inhibidor de la adhesión intercelular mediada por P-selectina o para diseñar inhibidores de la adhesión intercelular mediada por P-selectina. La presente invención incluye tanto las composiciones farmacéuticas que contienen proteínas ligando de P-selectina aisladas como usos terapéuticos que emplean la proteína ligando de P-selectina aislada.

45 La proteína ligando de P-selectina aislada, purificada a partir de células o producida de forma recombinante, puede usarse como composición farmacéutica cuando se combina con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha composición puede contener, además de la proteína ligando de P-selectina y de vehículos, diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales bien conocidos en la técnica. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente o ingredientes activos. Las características del vehículo dependerán de la vía de administración. La composición farmacéutica de la invención también puede contener citocinas, linfocinas y otros factores hematopoyéticos tales como M-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, G-CSF, Meg-CSF, factor de células madre y eritropoyetina. La composición farmacéutica puede contener factores trombolíticos o antitrombóticos tales como activador de plasminógeno y Factor VIII. La composición farmacéutica puede contener además otros agentes antiinflamatorios. Dichos factores adicionales y/o agentes pueden incluirse en la composición farmacéutica para producir un efecto sinérgico con la proteína ligando de P-selectina aislada o minimizar los efectos secundarios causados por la proteína ligando de P-selectina aislada. Por el contrario, la proteína ligando de P-selectina aislada puede incluirse en formulaciones de la citocina, linfocina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o antitrombótico o agente antiinflamatorio particular para minimizar los efectos secundarios de la citocina, linfocina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o antitrombótico o agente antiinflamatorio.

60 La composición farmacéutica de la invención puede estar en forma de un liposoma en el que la proteína ligando de P-selectina aislada se combina, además de con otros vehículos farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos

tales como lípidos, que existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos o capas laminares que están en solución acuosa. Los lípidos adecuados para formulación liposomal incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. La preparación de dichas formulaciones liposomales está dentro del nivel de especialidad en la técnica, como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.235.871; Patente de Estados Unidos N° 4.501.728; Patente de Estados Unidos N° 4.837.028; y Patente de Estados Unidos N° 4.737.323.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o método que es suficiente para demostrar un beneficio significativo para el paciente, es decir, curación de afecciones crónicas caracterizadas por adhesión celular mediada por P-selectina o aumento en la velocidad de curación de dichas afecciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual administrado en solitario, la expresión se refiere a ese ingrediente solamente. Cuando se aplica a una combinación, la expresión se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado el efecto terapéutico, ya se administren en combinación, en serie o simultáneamente.

Al poner en práctica el uso de la presente invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína ligando de P-selectina aislada se administra a un mamífero que tiene una patología mediada por P-selectina. La proteína ligando de P-selectina aislada puede administrarse de acuerdo con el uso de la invención en solitario o en combinación con otras terapias, tales como tratamientos que emplean citocinas, linfocinas u otros factores hematopoyéticos. Cuando se coadministra con una o más citocinas, linfocinas u otros factores hematopoyéticos, la proteína ligando de P-selectina aislada puede administrarse simultáneamente con la citocina o citocinas, linfocina o linfocinas, otro factor o factores hematopoyéticos, factores trombolíticos o antitrombóticos, o de forma secuencial. Si se administra de forma secuencial, el médico adjunto decidirá la secuencia de administración apropiada de la proteína ligando de P-selectina aislada en combinación con la citocina o citocinas, linfocina o linfocinas, otro factor o factores hematopoyéticos, factores trombolíticos o antitrombóticos.

La administración de la proteína ligando de P-selectina aislada usada en la composición farmacéutica o para poner en práctica el uso de la presente invención puede llevarse a cabo en una diversidad de formas convencionales, tales como ingestión oral, inhalación o inyección cutánea, subcutánea o intravenosa. Se prefiere la administración intravenosa al paciente.

Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína ligando de P-selectina aislada se administra por vía oral, la proteína ligando de P-selectina aislada estará en forma de un comprimido, cápsula, polvo, solución o elixir. Cuando se administra en forma de comprimido, la composición farmacéutica de la invención puede contener además un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. El comprimido, cápsula y polvo contienen de aproximadamente el 5% al 95% de proteína ligando de P-selectina aislada y, preferentemente, de aproximadamente el 25 al 90% de proteína ligando de P-selectina aislada. Cuando se administra en forma líquida, puede añadirse un vehículo líquido tal como agua, vaselina, aceites de origen animal o vegetal tales como aceite de cacahuete, aceite mineral, aceite de soja o aceite de sésamo, o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición farmacéutica puede contener además solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Cuando se administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene de aproximadamente el 0,5 al 90% en peso de la proteína ligando de P-selectina aislada y, preferentemente, de aproximadamente el 1 al 50% de proteína ligando de P-selectina aislada.

Cuando se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína ligando de P-selectina aislada por inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, la proteína ligando de P-selectina aislada estará en forma de una solución acuosa apirógena parenteralmente aceptable. La preparación de dichas soluciones de proteínas parenteralmente aceptables, teniendo en cuenta el pH, la isotonicidad, la estabilidad y similares, está dentro de la especialidad en la técnica. Una composición farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea debería contener, además de la proteína ligando de P-selectina aislada, un vehículo isotónico tal como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro sódico, inyección de Ringer lactato u otro vehículo que se conoce en la técnica. La composición farmacéutica de la presente invención también puede contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes u otros aditivos conocidos por los expertos en la materia.

La cantidad de proteína ligando de P-selectina aislada en la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección a tratar y de la naturaleza de tratamientos anteriores a los que se haya sometido el paciente. En última instancia, el médico adjunto decidirá la cantidad de proteína ligando de P-selectina aislada con la que tratar a cada paciente individual. Inicialmente, el médico adjunto administrará dosis reducidas de la proteína ligando de P-selectina aislada y observará la respuesta del paciente. Pueden administrarse dosis mayores de proteína ligando de P-selectina aislada hasta que se obtenga el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y en ese punto la dosificación ya no se aumenta más. Se contempla que las diversas composiciones farmacéuticas usadas para la práctica del método de la presente invención deberían contener de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 100 mg de proteína ligando de P-selectina aislada por kg de peso corporal.

La duración de la terapia intravenosa usando la composición farmacéutica de la presente invención variará dependiendo de la gravedad de la enfermedad a tratar y de la afección y de la respuesta idiosincrásica potencial de cada paciente individual. Se contempla que la duración de cada aplicación de la proteína ligando de P-selectina aislada estará en el intervalo de 12 a 24 horas de administración intravenosa continua. En última instancia, el médico adjunto decidirá la

duración apropiada de la terapia intravenosa usando la composición farmacéutica de la presente invención.

La proteína ligando de P-selectina aislada de la invención también puede usarse para inmunizar animales para obtener anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionen específicamente con la proteína ligando de P-selectina y que puedan inhibir la adhesión celular mediada por P-selectina. Dichos anticuerpos pueden obtenerse usando la proteína ligando de P-selectina completa como inmunógeno, o usando fragmentos de la proteína ligando de P-selectina tales como la proteína ligando de P-selectina madura soluble. También pueden usarse fragmentos más pequeños de la proteína ligando de P-selectina para inmunizar animales, tales como los fragmentos expuestos a continuación: del aminoácido 42 al aminoácido 56 de la SEC ID N°: 1 y del aminoácido 127 al aminoácido 138 de la SEC ID N°: 1. Un inmunógeno peptídico adicional comprende del aminoácido 238 al aminoácido 248 de la SEC ID N°: 1, con un resto de alanina añadido al extremo amino-terminal del péptido. Otro inmunógeno peptídico comprende del aminoácido 43 al aminoácido 56 de la SEC ID N°: 1, que tiene una tirosina sulfatada en cualquiera de o en todas las posiciones 46, 48 ó 51. Los inmunógenos peptídicos pueden contener además un resto de cisteína en el extremo carboxilo-terminal y están conjugados con un hapteno tal como hemocianina de lapa californiana (KLH). Pueden generarse inmunógenos peptídicos adicionales por sustitución de restos de tirosina con restos de tirosina sulfatada. Se conocen en la técnica métodos para sintetizar dichos péptidos, por ejemplo, como en R. P. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963); J. L. Krstenansky, et al, FEBS Lett. 211, 10 (1987).

Los anticuerpos monoclonales que se unen a la glicoproteína ligando de P-selectina o a restos de carbohidratos complejos característicos de la glicoproteína ligando de P-selectina pueden ser agentes de diagnóstico útiles para la inmunodetección de enfermedades inflamatorias y de algunas formas de cáncer. Algunas células cancerosas, tales como carcinomas pulmonares microcíticos, pueden expresar niveles detectables de la proteína ligando de P-selectina. Esta expresión anormal de la proteína ligando de P-selectina por células cancerosas puede desempeñar un papel en la metástasis de estas células.

Los anticuerpos monoclonales neutralizantes que se unen a la glicoproteína ligando de P-selectina o a carbohidratos complejos característicos de la glicoproteína ligando de P-selectina también pueden ser agentes terapéuticos útiles para tanto enfermedades inflamatorias como también en el tratamiento de algunas formas de cáncer en las que esté implicada una expresión anormal de la proteína ligando de P-selectina. Estos anticuerpos monoclonales neutralizantes son capaces de bloquear la función de adherencia intercelular mediada por selectina de la proteína ligando de P-selectina. Al bloquear la unión de la proteína ligando de P-selectina, la adherencia de leucocitos a sitios de inflamación inapropiada se suprime o se reduce notablemente. En el caso de células cancerosas o células leucémicas, pueden ser útiles anticuerpos monoclonales neutralizantes contra la proteína ligando de P-selectina en la detección y prevención de la propagación metastásica de las células cancerosas que puede estar mediada por la proteína ligando de P-selectina. Además, los anticuerpos monoclonales unidos a estas células pueden dirigirse a las células cancerosas para una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), contribuyendo de este modo a eliminar las células cancerosas. Los anticuerpos humanos que reaccionan con la proteína ligando de P-selectina pueden producirse en animales transgénicos que contienen inmunoglobulina humana que codifica genes en sus líneas germinales. El Ejemplo 7 a continuación expone la producción de un anticuerpo policlonal de conejo específico para fragmentos de proteína ligando de P-selectina.

La proteína ligando de P-selectina de la invención también puede usarse para explorar para agentes que sean capaces de unirse a la proteína ligando de P-selectina y por lo tanto puedan actuar como inhibidores de la adhesión intercelular mediada por P-selectina. Son bien conocidos en la técnica ensayos de unión que usan una proteína de unión deseada, inmovilizada o no, y pueden usarse con este fin usando la proteína ligando de P-selectina de la invención. Los ensayos de exploración apropiados pueden estar basados en células, como en el Ejemplo 3 a continuación. Como alternativa, pueden usarse ensayos de exploración basados en proteína purificada para identificar dichos agentes. Por ejemplo, puede inmovilizarse proteína ligando de P-selectina en forma purificada en un soporte y la unión a P-selectina purificada puede medirse en presencia y ausencia de agentes de inhibición potenciales. Un ensayo de unión adecuado puede emplear como alternativa P-selectina purificada inmovilizada en un soporte, con una forma soluble de la proteína ligando de P-selectina de la invención.

Puede usarse cualquier proteína ligando de P-selectina en los ensayos de exploración descritos anteriormente. Por ejemplo, la proteína ligando de P-selectina de longitud completa expuesta en la SEC ID N°: 1 del aminoácido 1 al aminoácido 402 puede usarse para explorar para inhibidores; o la proteína ligando de P-selectina madura expuesta en la SEC ID N°: 1 del aminoácido 42 al aminoácido 402 puede usarse para explorar para inhibidores, o la proteína ligando de P-selectina madura soluble expuesta en la SEC ID N°: 1 del aminoácido 42 al aminoácido 310 puede usarse para explorar para inhibidores. Como alternativa, la proteína ligando de P-selectina de la SEC ID N°: 3 del aminoácido 1 al aminoácido 412, o una forma madura de la proteína ligando de P-selectina como se expone en la SEC ID N°: 3 del aminoácido 42 al aminoácido 412, o una forma madura soluble de la proteína ligando de P-selectina expuesta en la SEC ID N°: 3 del aminoácido 42 al aminoácido 320 puede usarse para explorar para inhibidores de la adhesión intercelular de acuerdo con la presente invención.

En dicho ensayo de exploración, se forma una primera mezcla de unión por combinación de P-selectina y proteína ligando de P-selectina, y se mide la cantidad de unión en la primera mezcla de unión (B_0). También se forma una segunda mezcla de unión por combinación de P-selectina, la proteína ligando de P-selectina y el compuesto o agente a explorar, y se mide la cantidad de unión en la segunda mezcla de unión (B). Las cantidades de unión en la primera y segunda mezclas de unión se comparan, por ejemplo, realizando un cálculo de B/B_0 . Se considera que un compuesto o

agente es capaz de inhibir la adhesión intercelular mediada por P-selectina si se observa una disminución en la unión en la segunda mezcla de unión en comparación con la primera mezcla de unión. La formulación y optimización de mezclas de unión está dentro del nivel de especialidad en la técnica, dichas mezclas de unión pueden contener también los tampones y sales necesarios para aumentar u optimizar la unión y pueden incluirse ensayos de control adicionales en el ensayo de exploración de la invención.

Por lo tanto, pueden identificarse compuestos que se descubra que reducen al menos aproximadamente el 10%, preferentemente más de aproximadamente el 50% o más la actividad de unión de la proteína ligando de P-selectina a P-selectina y después explorarse secundariamente en otros ensayos de unión a selectina, incluyendo ensayos de unión a E-selectina y a L-selectina y ensayos *in vivo*. Por estos medios pueden identificarse compuestos que tengan actividad inhibitoria para la adhesión intercelular mediada por selectina que puedan ser adecuados como agentes antiinflamatorios.

EJEMPLO 1

CLONACIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA LIGANDO DE P-SELECTINA

A. Construcción de la genoteca de ADNc de HL60

Se construyó una genoteca de ADNc de HL60 para clonación y expresión del ligando de P-selectina. Se aisló ARN PoliA⁺ a partir del ARN total de la línea celular promielocítica humana HL60 (S. J. Collins, et al., anteriormente) usando un kit de aislamiento de ARNm Fast Track (Invitrogen; San Diego, CA). Se sintetizó el ADNc bicatenario a partir de la fracción de ARN PoliA⁺ y se ligó con extremos romos con los adaptadores EcoRI (5'-AATTCCGTCGACTCTAGAG-3', 5'-CTCTAGAGTTCGACGG-3'). El ADNc se ligó en el vector de expresión pMT21 (R. Kaufman et al, J. Mol. Cell. Biol. 9, 946-958 (1989)) que, de forma secuencial, se había incubado con endonucleasa EcoRI y fosfatasa alcalina intestinal de ternera y purificado en gel. El producto de ligación se usó en la electroporación de alícuotas de 2 μ l de células *E. coli* DH5 α competentes y cultivadas en 1 ml de medio SOB (J. Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pl. 90 (1989)) que se había complementado con MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glicerol al 2% durante una hora a 37°C. Para dividir la genoteca en subconjuntos más pequeños, se sembró en placas una alícuota de cada ml de suspensión bacteriana sobre placas de agar en presencia de ampicilina y se calculó el número de colonias por ml. Asumiendo que cada colonia representaba un clon de ADNc, se generaron 600.000 clones y se dividieron en subconjuntos de aproximadamente 16.000 clones por combinación. Cada una de las 38 combinaciones se cultivó durante una noche en caldo L en presencia de ampicilina, y los plásmidos se purificaron sobre un gradiente de CsCl.

B. Exploración para el gen de la proteína ligando de P-selectina

En la primera fase, se utilizó el ensayo de unión a LEC- γ 1 del Ejemplo 4(A) para realizar una selección de la genoteca de ADNc de HL60 y, de este modo, enriquecer para el plásmido de interés. Se cotransfectaron seis μ g de cada combinación de genoteca de ADNc de HL60 con 2 μ g de gen α 3/4FT (Ejemplo 2) en células COS. Aproximadamente 45 horas post-transfección, las células COS se levantaron de las placas por incubación de las células en EGTA 1 mM durante 15 min a 37°C, seguida de raspado con raspadores de células. Las células se lavaron dos veces en solución salina tamponada de Hanks que contenía calcio 1 mM (HBSS). Las células se resuspendieron en 4 ml de HBSS. Las células COS transfectadas resuspendidas se exploraron usando el ensayo de unión a LEC- γ 1 descrito en el Ejemplo 4(A).

Los plásmidos de células COS adherentes se recuperaron a partir de un extracto de Hirts [B. Hirts, J. Mol. Biol., 26, 365-369 (1967)] y después se usaron en la electroporación de células *E. coli* DH5 α para su amplificación. La población enriquecida de plásmidos se purificó sobre un gradiente de CsCl y volvió a transfectarse junto con el gen de 3/4FT (Ejemplo 2) en células COS. Los procedimientos de transfección, exploración y amplificación de plásmido se repitieron durante un total de tres veces antes de que se detectara visualmente una combinación que se unía a las placas revestidas con LEC- γ 1. La combinación de plásmido positivo se descompuso posteriormente en subconjuntos. Esto implicaba la electroporación del extracto de Hirts de la combinación positiva en células *E. coli* DH5 α y la cuantificación de las colonias por ml como se ha descrito anteriormente. Se produjeron diversos tamaños de combinaciones por siembra de un número predeterminado de colonias en placas de agar en presencia de ampicilina. Se prepararon placas por duplicado realizando transferencias a nitrocelulosa y almacenando los filtros en nuevas placas de agar. Las placas por duplicado servían como placas de referencia para seleccionar colonias individuales o grupos de colonias de cualquier combinación identificada como positiva.

En la segunda fase de clonación, las células COS se cotransfectaron con las combinaciones de subgenotecas y el gen de 3/4FT mediante el mismo procedimiento usado en las etapas iniciales de exploración. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células transfectadas se exploraron usando el ensayo de CHO:P-selectina fluorescente del Ejemplo 4(B). Las combinaciones positivas se subdividieron adicionalmente, como se ha descrito anteriormente, hasta que finalmente se exploraron colonias individuales y se identificaron los clones positivos. Usando este método, se descubrió que un solo clon positivo, pMT21:PL85, codificaba la proteína ligando de P-selectina. La secuencia de ADN del ligando de P-selectina contenida en pMT21:PL85 se expone en la SEC ID N°: 1, y las características de unión de la proteína ligando de P-selectina codificada por pMT21:PL85 se exponen en el Ejemplo 4(C) a continuación.

EJEMPLO 2**CLONACIÓN DEL GEN DE LA α 1,3/1,4 FUCOSILTRANSFERASA**

El gen de la α 1,3/1,4 fucosiltransferasa (3/4FT) se clonó a partir de ADN genómico humano total (Clontech Laboratories) por medio de PCR. El cebador oligonucleotídico con sentido contenía un sitio XbaI y el extremo terminal 5' del gen (5'-TAGCATACGCTCTAGAGCATGGATCCCCTGGGTGCA GCCAAGC-3'), y el cebador oligonucleotídico antisentido contenía un sitio EcoRI y el extremo terminal 3' del gen (5'-CCGGAATTCTCAGGTGAA CCAAGCCGC-3'). El producto de PCR se digirió secuencialmente con XbaI y EcoRI y se purificó por procedimientos de purificación en gel convencionales. Este gen se ligó después con el vector pMT3Sv2ADA (R. Kaufman, Methods in Enzymology, anteriormente) que también se había digerido secuencialmente con XbaI y EcoRI y purificado por métodos de purificación en gel convencionales. Se transformaron células HB101 competentes (Biorad) con este producto de ligación y después se sembraron en placas de agar en presencia de ampicilina. Se sondaron transferencias de filtro de nitrocelulosa de transformantes resistentes a ampicilina con un oligonucleótido radiomarcado (5'-AAGTATCTGTCCAGGGCTCCAGGT-3') complementario a la región de nucleótidos 506-530 en la mitad del gen (J. Sambrook et al, anteriormente).

Se prepararon minipreparaciones de ADN plasmídico a partir de doce clones positivos. Después, el ADN purificado se digirió con EcoRI y XbaI para identificar el clon correcto con el inserto de tamaño apropiado. Este clon (pEA.3/4FT) se cultivó después a gran escala y el ADN se aisló por separación en bandas de gradiente de densidad de CsCl (J. Sambrook et al, anteriormente). La secuenciación de ADN confirmó la identidad del gen de 3/4FT. La funcionalidad del gen se evaluó en un ensayo de unión célula-célula de la forma siguiente. Se transfectaron células de mono COS-1 [(clon M6; M. Horwitz et al, Mol. Appl. Genet., 2: 147-149, (1983)] con 3/4FT usando DEAE dextrano seguido de tratamiento de choque con DMSO e incubación con cloroquina [L. Sompey et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 78: 7575-7578 (1981); M. Lopata et al, Nucleic Acid Res, 12: 5707-5717, (1984); H. Luthman y G. Magnuson, Nucleic Acids Res., 11: 1295-1308, (1983)]. Las células COS transfectadas se suspendieron y cuantificaron por su unión a una línea de CHO que expresaba E-selectina [G. Larsen et al, J. Biol. Chem 267: 11104-11110, (1992)]. Este ensayo confirmó que las células COS transfectadas con 3/4FT pueden expresar el epítipo de Lewis^x sialilado en la superficie celular.

EJEMPLO 3**EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA LIGANDO DE P-SELECTINA****A. Expresión del ligando de P-selectina en células LEC11**

Se expresó ligando de P-selectina funcional en la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) positiva a SLe^x LEC11 (Campbell, C. y Stanley, P. Cell 35: 303-309 (1983)) de la forma siguiente: se transfectaron aproximadamente 8 μ g de plásmido que contenía el gen de ligando de P-selectina (pMT21:PL85, Ejemplo 1) en células LEC11. A las 68 horas post-transfección, las células se trataron con butirato sódico 2,5 mM durante 4 horas. Se observó que las células inducían la adhesión de P-selectina, según se determinó usando el ensayo de unión celular de CHO:P-selectina marcada con 6-CFD (descrito en el Ejemplo 4, sección B). Por el contrario, ni las células LEC11 en solitario ni las células LEC11 transfectadas con un plásmido de control inducían la adhesión de P-selectina.

B. Expresión de ligando de P-selectina soluble en células COS

Se transfectaron células COS con 8 μ g de pED.sPSL.T7 (véase el Ejemplo 5C) y 4 μ g de plásmido pEA.3/4FT del Ejemplo 2, 8 μ g de pED.sPSL.T7 en solitario u 8 μ g de vector plasmídico (pMT21) y 4 μ g de gen pEA.3/4FT. Cuarenta y cinco horas post-transfección, las células se aclararon dos veces en PBS y se incubaron durante una noche a 37°C en DMEM sin suero sin rojo fenol (JRH Biosciences) complementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 μ g/ml. Se añadió fluoruro de fenilmetilsulfonilo, aprotinina y NaN₃ a concentraciones finales de 1 mM, 2 μ g/ml y 0,02%, respectivamente, y el medio acondicionado se centrifugó para eliminar todos los residuos.

Para los experimentos de inmunoprecipitación, la proteína ligando de P-selectina soluble marcada se produjo por cotransfección de células COS con pED.sPSL.T7 y pEA.3/4FT. A las cuarenta y cinco horas post-transfección, las células COS se marcaron con ³⁵S-metionina (NEN) 250 μ Ci/ml durante 5 horas y se recogió el medio. Se confirmó la expresión de proteína sPSL.T7 por inmunoprecipitación con anticuerpos anti-T7.

C. Expresión de ligando de P-selectina escindido por PACE en células COS

Se cotransfectaron células COS con el plásmido pED.sPSL.T7 del Ejemplo 5(C), el ADNc de pEA.3/4FT del Ejemplo 2 y un plásmido que contenía el ADNc de PACE como se expone en la SEC ID N°: 5. Se realizó una cotransfección de control paralela usando solamente el plásmido pED.sPSL.T7 y el plásmido pEA.3/4FT. Después de 45 horas, el medio acondicionado de estas células COS transfectadas se usó para recubrir placas de plástico y se determinó la unión a células CHO:P-selectina (Ejemplo 4). Se observó un aumento de aproximadamente dos veces en las células CHO:P-selectina unidas para placas recubiertas con medio que contenía el ligando de P-selectina coexpresado con PACE, en comparación con medio que contenía ligando de P-selectina que no se había coexpresado con PACE. La secuenciación de aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína sPSL.T7 purificada de la cotransfección con PACE mostraba que todo el ligando se había escindido en el sitio consenso de PACE (aminoácidos 38-41 de la SEC ID N°: 1). El radiomarcaje de células COS cotransfectadas con ³⁵S-metionina y la posterior electroforesis en gel de poliacrilamida-

SDS y autorradiografía mostró que se habían secretado cantidades comparables del ligando de P-selectina en ambas cotransfecciones.

D. Expresión de la proteína ligando de P-selectina en células CHO

5 Se expresó una forma de longitud completa (aminoácidos 1-402) de la proteína ligando de P-selectina en la línea celular CHO(DUKX) (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220 (1980)) de la forma siguiente: se
 10 cotransfectaron aproximadamente 25 µg del plásmido pMT21:PL85 y aproximadamente 8 µg del pED.3/4FT (producido por restricción de pEA.3/4FT con EcoRI y XbaI e inserción del fragmento resultante en el plásmido pED) en células CHO(DUKX) usando el método de fosfato de calcio. Se seleccionaron los transfectantes por resistencia a metotrexato.
 15 Después de dos semanas, se exploraron las colonias individuales para determinar la expresión de SLe^x usando un conjugado de un anticuerpo anti-SLe^x (CSLEX-1, documento U.S. 4.752.569) y eritrocitos de oveja (sRBC) preparados por el método de cloruro de cromo (Goding, J. W. J. Immunol. Methods 10: 61-66 (1976) de la forma siguiente: se lavaron sRBC con NaCl 0,15 M hasta que el lavado se volvió transparente y después se preparó una suspensión al 50%
 20 de sRBC en NaCl 0,15 M. Se añadió un ml de solución de cloruro de cromo al 0,01% gota a gota mientras se agitaba vorticialmente a 0,2 ml de una suspensión de sRBC que contenía 50 µg de CSLEX-1. Después de la incubación a 37°C durante 30 minutos, se añadieron 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a la reacción. El conjugado se lavó una vez antes de resuspender en 10 ml de PBS. Las placas que contenían transfectantes se lavaron con PBS y después se añadieron 3 ml de PBS y un ml del conjugado de sRBC/CSLEX-1 a cada placa. Las colonias positivas eran rojas en un transiluminador y se escogieron en medio alfa con suero bovino fetal al 10%. Después de dos semanas, las colonias se sometieron a una amplificación por etapas usando metotrexato a concentraciones de 2, 10, 25, 100, 250 nM.
 La línea celular estable obtenida se denominó CD-PSGL-1 (R3.4). La expresión de la proteína ligando de P-selectina se confirmó por estudios de inmunoprecipitación usando el anticuerpo policlonal anti-proteína ligando de P-selectina del Ejemplo 7(A). La funcionalidad de la proteína ligando de P-selectina producida por la línea celular CD-PSGL-1 (R3.4) se ensayó ensayando los transfectantes para determinar su unión a LEC-γ1 como en el Ejemplo 4(A).

25 La proteína sPSL.T7 se expresó en una línea CHO-PACE estable que ya estaba expresando el ADNc que codifica PACE como se expone en la SEC ID N°: 5 bajo selección con adenosina desaminasa (Kaufman, et al, PNAS (USA) 83: 3136-3140 (1986)). Los plásmidos psPSL.T7 (25 µg) y pED.3/4FT (8 µg) se cotransfectaron en células CHO-PACE usando el método de fosfato de calcio. Se seleccionaron los transfectantes por su resistencia a metotrexato y se escogieron colonias individuales que se unían al conjugado de sRBC/CSLEX-1. Después de dos semanas en cultivo, las colonias se sometieron a una amplificación por etapas como se ha descrito anteriormente. La línea celular estable
 30 obtenida se denominó PSL/CP-T7 (R4.1). La expresión de la proteína sPSL.T7 se confirmó por métodos de inmunoprecipitación convencionales usando un anticuerpo monoclonal específico de T7 o la quimera de LEC-γ1 del Ejemplo 4(A). De una forma similar, se obtuvo una línea celular estable que expresaba la forma de longitud completa madura (aminoácidos 42-402) de la proteína ligando de P-selectina por cotransfección de pMT21:PL85 y pED.3/4FT en la línea CHO-PACE.

35 Se construyeron líneas celulares estables que expresaban la proteína sPSL.Q del Ejemplo 5(B) y la proteína sPSL.Fc del Ejemplo 5(B) de la forma siguiente: los plásmidos pED.sPSL.Q (25 µg) o pED.sPSL.Fc (25 µg) se cotransfectaron con aproximadamente 25 µg del plásmido pED.3/4FT descrito anteriormente y aproximadamente 20 µg de un plásmido que contenía el ADNc de PACE como se expone en la SEC ID N°: 5), así como el gen de resistencia a neomicina en las células CHO(DUKX) usando el método de fosfato de calcio. Se seleccionaron los transfectantes por su resistencia a
 40 metotrexato y al antibiótico G418. Aproximadamente dos semanas después, se exploraron colonias individuales para determinar la expresión de SLe^x usando la unión a conjugado de sRBC/CSLEX-1. Las colonias positivas se escogieron en medio con G418 a concentración de 1 mg/ml. Después de 2-3 semanas en cultivo, las células se amplificaron con metotrexato en una selección por etapas. Las líneas celulares estables obtenidas se denominaron CD-sPSL.Q (R8.2) y CD-sPSL.Fc (R8.1), respectivamente. La expresión de proteína sPSL.Q y sPSL.Fc se confirmó por un método de
 45 inmunoprecipitación convencional usando el anticuerpo policlonal anti-proteína ligando de P-selectina del Ejemplo 7(A).

EJEMPLO 4

ENSAYOS DE ADHESIÓN INTERCELULAR MEDIADA POR P-SELECTINA

A. Ensayo de unión a LEC-γ1

50 Se construyó un ADN que codifica una forma quimérica de P-selectina conjugada con la porción Fc de una IgGγ1 humana (LEC-γ1) usando métodos conocidos (Aruffo et al. Cell 67, 35-44 (1991)) y se transfectó de forma estable en células CHO dhfr⁻ (CHO DUKX) para un alto nivel de producción de la proteína LEC-γ1 quimérica, que se purificó para usarse en el ensayo de unión expuesto a continuación.

55 Se recubrieron placas de Petri primero con un anticuerpo policlonal anti-Fc de IgGγ1 humana y después con LEC-γ1. Este método orienta la construcción de LEC-γ1 de modo que la porción de P-selectina de la molécula quimérica se presenta en la superficie de las placas. Se cuantificó la adhesión de células HL60 a la LEC-γ1 orientada en presencia y ausencia de calcio. Se demostró que la adhesión de HL60 era dependiente de calcio, confirmando que la molécula quimérica había conservado la unión funcional de P-selectina a su ligando en células HL60. También se demostró que la unión de células HL60 a LEC-γ1 orientada se bloqueaba por un anticuerpo monoclonal neutralizante contra P-selectina, demostrando la especificidad de la unión de P-selectina.

B. Ensayo de unión de CHO-P-selectina fluorescente

El ensayo empleaba una línea celular de CHO:P-selectina marcada fluorescentemente (Larsen et al., J. Biol. Chem. 267, 11104-11110 (1992)) que puede unirse a y formar grupos en la superficie de células COS que se cotransfectan con el gen de ligando de P-selectina y el gen de 3/4FT. Las células de CHO:P-selectina se resuspendieron a $1,5 \times 10^6$ células/ml en suero bovino fetal al 1% en medio DME y se marcaron por adición de diacetato de 6-carboxifluoresceína (6-CFD) hasta una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$. Después de la incubación a 37°C durante 15 minutos, las células se lavaron en medio y se resuspendieron a 1×10^5 células/ml. Se añadieron 5 ml de las células marcadas a cada placa que contenía transfectantes de COS lavadas a ensayar y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se eliminaron las células no adherentes mediante cuatro lavados con medio. Después, las placas se exploraron por microscopía de fluorescencia para determinar rosetas de células CHO:P-selectina adherentes.

C. Ensayo de adhesión cuantitativa usando células CHO:P-selectina marcadas radiactivamente

Se cotransfectaron células COS con el plásmido pMT21:PL85 del Ejemplo 1 y el plásmido pEA.3/4FT del Ejemplo 2 mediante el mismo procedimiento usado en las fases iniciales de exploración. Como controles, se transfectaron células COS con pMT21:PL85 solamente o con pEA.3/4FT solamente, o con un plásmido similar que no contenía inserto ("transfección simulada"). 24 horas después de la transfección, las células transfectadas se trataron con tripsina y se distribuyeron en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos Costar. Se marcaron las células CHO:P-selectina durante 16 horas con ^3H -timidina usando métodos conocidos y se preincubaron a $0,5 \times 10^5$ células/ml durante 30 minutos a 4°C en un medio que contenía BSA al 1% (control); un medio que contenía BSA al 1%, EDTA 5 mM y EGTA 5 mM; medio α que contenía BSA al 1% y 10 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo monoclonal anti-P-selectina neutralizante; y un medio que contenía BSA al 1% y un anticuerpo monoclonal anti-P-selectina no neutralizante. Las células preincubadas se añadieron después a los pocillos que contenían las células COS transfectadas. Después de una incubación de 10 minutos, las células no unidas se eliminaron mediante 4 cambios de medio. Las células CHO:P-selectina unidas se liberaron por tratamiento con tripsina y se cuantificaron por recuento de centelleo.

Las células COS cotransfectadas con ligando de P-selectina y la 3/4FT inducían aproximadamente 5,4 veces más unión de células CHO:P-selectina respecto a células COS con transfección simulada; el ensayo en presencia de EGTA y EDTA reducía la unión a nivel de las células COS con transfección simulada. Asimismo, la incubación con anticuerpo neutralizante anti-P-selectina también eliminaba la unión específica, mientras que el anticuerpo no neutralizante no tenía efecto. Por el contrario, la unión de CHO:P-selectina a células COS transfectadas con ligando de P-selectina solamente no era estadísticamente diferente de la unión a las COS con transfección simulada tanto en presencia como en ausencia de EDTA y EGTA, o anticuerpos anti-P-selectina. La unión de células CHO:P-selectina a células COS transfectadas con 3/4FT solamente era aproximadamente 2 veces mayor que a las COS con transfección simulada, pero no se veía afectada por la presencia o ausencia de EDTA y EGTA.

EJEMPLO 5**CONSTRUCCIÓN DE LIGANDOS DE P-SELECTINA SOLUBLES**

Los adaptadores de EcoRI usados para generar la genoteca de ADNc a partir de células HL60 en el Ejemplo I contienen un tipo de restricción XbaI (TCTAGA) justo 5' del comienzo de la SEC ID N°: 1 como se localiza en el plásmido pMT21:PL85. Para generar formas solubles del PSL, el plásmido pMT21:PL85 se digirió por restricción con XbaI y HincII (que escinde después del nucleótido 944 de la SEC ID N°: 1). El fragmento de aproximadamente 950 pb generado de este modo, que contenía todo el segmento extracelular codificado del ligando hasta e incluyendo el codón para valina 295, se aisló y se usó para generar ADN que codifican formas solubles de la proteína del ligando de P-selectina como se expone en las secciones A a D a continuación.

A. Construcción de psPSL.OC

El fragmento se purificó y se ligó en un vector de expresión de mamífero pED entre los sitios XbaI y EcoRI, junto con el ADN oligonucleotídico sintético bicatenario que recreaba los codones de Asn 296 a Cys 310 e introducía un nuevo codón de terminación inmediatamente después de Cys 310. La secuencia de los oligonucleótidos era la siguiente:

5'-AACTACCCAGTGGGAGCACCAGACCACATCTCTGTGAAGCAGTGCTAG

5'-AATTCTAGCACTGCTTCACAGAGATGTGGTCTGGTGCTCCCACTGGGTA

GTT

El plásmido resultante se denominó pED.sPSL.QC, y la proteína expresada a partir del plásmido se denominó sPSL.QC.

B. Construcción de psPSL.O

El fragmento se purificó y se ligó en el plásmido pED (Kaufman et al., 1991) entre los sitios XbaI y EcoRI junto con el ADN oligonucleotídico sintético bicatenario que recreaba los codones de Asn 296 a Gln 309 e introducía un nuevo codón de terminación inmediatamente después de Gln 309. La secuencia de los oligonucleótidos es la siguiente:

5'-AACTACCCAGTGGGAGCACCAGACCACATCTGGTGAAGCAGTAG

5'-AATTCTACTGCTTCACAGAGATGTGGTCTGGTGCTCCCACTGGGTAGTT

El plásmido resultante se denominó pED.sPSL.Q y la proteína expresada a partir del plásmido se denominó sPSL.Q.

C. Construcción de psPSL.T7

5 Se sintetizaron oligonucleótidos que codifican 14 aminoácidos que incluyen un epítipo derivado de la proteína principal de la cápside de fago T7, creando una fusión C-terminal del "marcador" epitópico con 32 aminoácidos adicionales derivados de la secuencia de vector. Dos oligonucleótidos que tenían las secuencias

5'-CTAGACCCGGGATGGCATCCATGACAGGAGGACAACAAATGGTAGGCC

GTAG y

5'-AATTCTACGGCCTACCCATTTGTTGTCCTCTGTCATGGATGCCATCCCG

10 GGT

formaron un dúplex y se ligaron con el fragmento de XbaI-EcoRI grande del plásmido de expresión de mamífero pED. El plásmido resultante, pED.T7, se digirió por restricción con XbaI y SmaI y se ligó con el fragmento de XbaI-HincII de 950 pb descrito anteriormente, dando como resultado el plásmido pED.sPSL.T7.

La proteína resultante de la expresión de pED.sPSL.T7 se denominó sPSL.T7.

15 D. Construcción de quimera de ligando de P-selectina soluble-IgGF α

El ADN plasmídico que codifica una forma extracelular soluble de la proteína ligando de P-selectina fusionada a la porción Fc de la inmunoglobulina IgG1 humana se construyó de la forma siguiente: el vector de expresión de mamífero pED.Fc contiene secuencias que codifican la región Fc de una IgG1 humana con una nueva secuencia enlazadora que permite la fusión de secuencias codificantes aminoterminales con la región bisagra por medio de un sitio de restricción XbaI único. Se realizó una ligación de tres fragmentos: el pED.Fc se digirió por restricción con XbaI y se purificó en gel en forma lineal. El fragmento de 950 pb de pMT21:PL85 descrito anteriormente comprendía el segundo fragmento. El tercer fragmento consistía en ADN oligonucleotídicos sintéticos hibridados que tenían la secuencia siguiente:

5'-CTGCGGCCGCAGT

5'-CTAGACTGCGGCCGCAG

25 Los productos de ligación se cultivaron como ADN plasmídicos y se identificaron clones individuales que tenían la configuración correcta por secuenciación de ADN. El plásmido se denominó pED.PSL.Fc. La región codificante de ADN de la proteína de fusión de ligando de P-selectina soluble/Fc resultante se muestra en la SEC ID N°: 6.

EJEMPLO 6

CARACTERIZACIÓN DE LIGANDOS DE P-SELECTINA EXPRESADOS

30 A. Caracterización de la unión de proteína ligando de P-selectina de longitud completa en células COS

La cotransfección de células COS con el plásmido pEA.3/4FT del Ejemplo 2 y el plásmido pMT21:PL85 del Ejemplo 1 produce células COS que se unen específicamente a células CHO:P-selectina. Esta unión se observa sólo tras la cotransfección de pEA.3/4FT y pMT21:PL85; el uso de cualquier plásmido en solitario genera células COS que no se unen a células CHO:P-selectina. No se observa unión entre la línea celular CHO(DUKX) parental que no expresa P-selectina y células COS cotransfectadas con pEA.3/4FT y pMT21:PL85. La unión entre las células COS cotransfectadas y células CHO:P-selectina es sensible a quelantes de iones divalentes tales como EDTA y EGTA, lo que concuerda con la dependencia de Ca⁺⁺ de la adhesión celular mediada por P-selectina. Un anticuerpo monoclonal neutralizante anti-P-selectina bloqueaba la unión entre las células CHO:P-selectina y las células COS que se habían cotransfectado con pEA.3/4FT y pMT21:PL85, mientras que un anticuerpo monoclonal no neutralizante anti-P-selectina no tenía efectos sobre la unión. Los resultados de anticuerpo indican que el dominio o dominios funcionales de P-selectina son necesarios para unirse a la proteína ligando de P-selectina expresada en la superficie de células COS.

B. Caracterización electroforética de ligando de P-selectina de longitud completa expresado en células COS

Se prepararon extractos con detergente de células COS cotransfectadas de la forma siguiente: 45 horas después de la cotransfección, se suspendieron aproximadamente $1,5 \times 10^7$ células en 5 ml de tampón de lisis (ácido piperazin-N,N-bis[2-etanosulfónico] 10 mM (PIPES) pH 7,5, KCl 100 mM, MgCl₂ 3 mM, benzamidina 1 mM, leupeptina 0,5 µg/ml, pepstatina 0,75 µg/ml, etilmaleimida 1 mM y aprotinina 1 µg/ml) y se lisaron por sonicación. Se eliminaron los residuos celulares por centrifugación a baja velocidad (500 x g, 10 minutos), y se recogió una fracción de membrana por ultracentrifugación (100.000 x g, 60 min). Se resuspendió el sedimento de membrana a alta velocidad en un tampón de extracción (ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico 10 mM) (MOPS) pH 7,5, NaCl 0,1M, NaN₃ al 0,02%, Thesit® al 1% (Sigma), benzamidina 1 mM, leupeptina 0,5 µg/ml, pepstatina 0,75 µg/ml, etilmaleimida 1 mM y aprotinina 1 µg/ml). Después, las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida SDS y se transfirieron a transferencias de nitrocelulosa de la forma siguiente: una alícuota del extracto con detergente se suspendió en tampón de carga de SDS

al 1% y se calentó durante 5 minutos a 100°C antes de cargarla en un gel de poliacrilamida al 8-16% (reducido) o un gel al 6% (no reducido), y se sometió a electroforesis en el sistema de tampón de Laemmli. Se prepararon las transferencias usando membranas de transferencia Immobilon-P®. Las transferencias se sumergieron en MOPS 10 mM pH 7,5, NaCl 0,1M, NaN₃ al 0,02%, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM y leche desnatada al 10% durante una noche a 4°C. Las transferencias se aclararon una vez en el tampón anterior sin la leche y se incubaron en tampón de transferencia (MOPS 10 mM pH 7,5, NaCl 0,1M, albúmina de suero bovino al 1%, Thesit al 0,05%, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Después, las transferencias se sondaron para el ligando de P-selectina de la forma siguiente: se preincubaron 50 ng de una quimera de P-selectina/Fc con 3 µCi de ¹²⁵I-Proteína A en tampón de transferencia durante 30 minutos a temperatura ambiente. Podían añadirse excipientes adicionales (por ejemplo, EDTA, EGTA, anticuerpos monoclonales) a la mezcla de preincubación en este punto para evaluar sus efectos sobre la unión de la quimera al ligando de P-selectina. La mezcla preincubada se incubó después con las transferencias (preparadas como anteriormente) durante 60 minutos a temperatura ambiente, y las transferencias se lavaron posteriormente cuatro veces con el mismo tampón de transferencia (sin albúmina de suero bovino), se secaron al aire y sometieron a autorradiografía a -70°C.

En condiciones no reductoras, se observaron dos bandas con esta técnica para extractos de membrana preparados a partir de células COS cotransfectadas. La banda principal migraba con un peso molecular estimado de aproximadamente 220 kD, mientras que la banda minoritaria migraba con un peso molecular de aproximadamente 110 kD. En condiciones reductoras, sólo se observaba una única banda con un peso molecular de aproximadamente 110 kD, indicando que, en condiciones no reductoras, el ligando de P-selectina existe como homodímero. El peso molecular aproximado del monómero reducido es superior al esperado a partir de la secuencia de aminoácidos deducida del clon de ADNc (45 kD), indicando que la proteína expresada experimenta una modificación postraduccional amplia (véase el Ejemplo 6(C)). La especificidad de la quimera de P-selectina/Fc se confirmó por la observación de que una sonda de IgG₁ inespecífica no producía bandas en las transferencias. Además, la unión de la quimera de P-selectina/Fc a las transferencias se suprimía por EDTA, EGTA y un anticuerpo monoclonal neutralizante anti-P-selectina. Se observaron bandas específicas en las transferencias sólo a partir de extractos de membrana de células COS cotransfectadas con los plásmidos pEA.3/4FT y pMT21:PL85. Los extractos de membrana de transfecciones de control (pEA.3/4FT o pMT21:PL85 solamente) no producían bandas observables en las transferencias.

C. Glicosilación de proteína ligando de P-selectina

La presencia de carbohidrato unido covalentemente en ligando de P-selectina recombinante y su papel en la unión a P-selectina se determinó de la forma siguiente: se cotransfectaron células COS con pED.sPSL.T7 del Ejemplo 5(C) y el plásmido pEA.3/4FT del Ejemplo 2. Después de 48 horas, las células se estimularon con ³⁵S-metionina. Se incubaron 200 µl de medio acondicionado de sPSL.T7 marcado con ³⁵S-metionina con 5 µg de LEC-γ1 en presencia de CaCl₂ 2 mM y albúmina de suero bovino 1 mg/ml (BSA). Después de hacerse girar durante 2 horas a 4°C, se añadieron perlas de Proteína A-Sepharose (Pharmacia) durante 1 hora a 4°C, se sedimentaron por centrifugación y se lavaron dos veces en solución salina tamponada con Tris (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,5, en lo sucesivo TBS) que contenía CaCl₂ 2 mM y BSA 1 mg/ml. Después, los sedimentos se resuspendieron y se trataron con neuraminidasa (*Streptococcus pneumoniae*), O-glicanasa y N-glicanasa (todas de Genzyme) de la forma siguiente. Todas las digestiones con glicosidasa se realizaron a 37°C durante una noche. Para la digestión con neuraminidasa, el sedimento se resuspendió en 50 µl de tampón de ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES), pH 6,5 (Calbiochem) y SDS al 0,1%, se calentó a 95°C durante 5 minutos, después se sedimentó. El sobrenadante se modificó para que contuviera n-octil B-D-glucopiranosido (OGP) al 1,4%, acetato de calcio 10 mM, cacodilato sódico 20 mM y PMSF 2,5 mM, pH final 7,0. Se añadieron ocho µl de neuraminidasa para una concentración final de 1 unidad/ml. Para la digestión con neuraminidasa/O-glicanasa, la muestra se preparó como anteriormente y junto con la neuraminidasa, también se añadió O-glicanasa a una concentración final de 0,1 unidades/ml. Para la digestión con N-glicanasa, el sedimento se resuspendió en 54 µl de tampón MES y SDS al 1%, se calentó a 95°C durante 5 minutos, después se sedimentó. El sobrenadante se modificó para que contuviera fosfato sódico 0,2 M, OGP al 3,5% y PMSF 2,5 mM, pH final 8,5. Se añadió N-glicanasa para una concentración final de 12 unidades/ml y se incubó como anteriormente.

El efecto del tratamiento con glicosidasa sobre sPSL.T7 se evaluó de dos formas. Para esto, cada muestra de proteína digerida se dividió en dos fracciones equivalentes. Una fracción se precipitó con el anticuerpo policlonal de P-selectina del Ejemplo 7(A), para mostrar el efecto de la digestión sobre la movilidad electroforética. La otra fracción se precipitó con la quimera de LEC-γ1 del Ejemplo 4(A) para evaluar la actividad de unión del ligando de P-selectina restante después de la digestión. Las muestras inmunoprecipitadas se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS en condiciones reductoras y autorradiografía.

En ausencia de tratamiento con glicosidasa, la autorradiografía puso de manifiesto bandas comparables (con pesos moleculares de 110 kD) para cada precipitación. Cuando la proteína ligando de P-selectina se trató con neuraminidasa, la precipitación con anticuerpo policlonal anti-ligando de P-selectina puso de manifiesto una ligera disminución en la movilidad, que concuerda con la eliminación de restos de ácido siálico. La cantidad de proteína ligando de P-selectina precipitada por LEC-γ1 se reducía significativamente después del tratamiento con neuraminidasa, lo que concuerda con el papel de los restos de ácido siálico en la interacción de P-selectina/ligando de P-selectina. Cuando la proteína ligando de P-selectina se trató tanto con neuraminidasa como con O-glicanasa, se observó un aumento sustancial en la movilidad electroforética después de la precipitación con el anticuerpo policlonal anti-ligando de P-selectina, indicando

que se habían eliminado varias cadenas de oligosacáridos ligados a O. Sin embargo, la eliminación de oligosacáridos ligados a O de la proteína ligando de P-selectina puede no haber sido completa, puesto que la movilidad electroforética no correspondía a una proteína con un peso molecular de 38 kD, como se esperaría a partir de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 1. La proteína ligando de P-selectina digerida con neuraminidasa/O-glicanasa se unía a LEC- γ 1 muy mal, indicando además el papel de los oligosacáridos en la interacción de P-selectina/ligando de P-selectina. El tratamiento del ligando de P-selectina purificado con N-glicanasa dio como resultado un ligero aumento en la movilidad electroforética, demostrando que algunos de los sitios de consenso para la glicosilación ligada a N están ocupados. La cantidad de proteína ligando de P-selectina precipitada por LEC- γ 1 se reducía ligeramente, indicando que la glicosilación ligada a N también contribuye a la interacción de P-selectina/ligando de P-selectina, aunque no tan radicalmente como la sialilación y la glicosilación ligada a O.

EJEMPLO 7

ANTICUERPOS POLICLONALES ESPECÍFICOS PARA LIGANDOS DE P-SELECTINA

A. Policlonal de conejo anti-proteína de fusión de proteína ligando de P-selectina/proteína de unión a maltosa

Se generó el anticuerpo policlonal anti-ligando de P-selectina inmunizando conejos con una proteína de fusión generada en *E. coli*. La proteína de fusión consistía en el tercio amino-terminal del ligando de P-selectina (aminoácidos 1 a 110 de la SEC ID N°: 1) fusionado en fase de lectura a la proteína de unión a maltosa (Maina, C. V. et al., *Gene* 74, 365-373 (1988); Riggs, P., en *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel et al., Eds., Greene Associates/Wiley Interscience (Nueva York, 1990) capítulo 16.6). En las condiciones empleadas en la presente memoria, el anticuerpo de proteína de fusión reconoce la proteína ligando de P-selectina.

B. Policlonal de conejo anti-proteína sPSL.T7

Se purificó una forma soluble de la invención (sPSL.T7; véase el Ejemplo 5(C)) hasta una homogeneidad aparente de acuerdo con el esquema siguiente: se transfectaron células COS con tres plásmidos, codificando uno cada uno de los siguientes: sPSL.T7 (Ejemplo 5(C)), 3/4FT (Ejemplo 2) y una forma soluble de PACE (como se expone en la SEC ID N°: 5). Después de 72 horas, el medio acondicionado se recogió y se purificó sPSL.T7 recombinante de la forma siguiente.

El medio acondicionado se diluyó dos veces con MOPS 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,5 mM y MnCl₂ 0,5 mM, pH 7,2 y se aplicó a una columna de lentil lectin-Sepharose 4B equilibrada en el mismo tampón. Después de la carga, la columna se lavó con el mismo tampón hasta que la absorbancia óptica a 280 nm disminuía hasta un nivel basal estable. La columna se eluyó después con el mismo tampón que se había ajustado a α -metil-manósido 0,5 M y NaCl 0,3 M. Se recogió la sPSL.T7 recombinante a lo largo de 5-15 volúmenes de columna de este tampón de elución. El eluido de lentil lectina se sometió después a una precipitación con sulfato de amonio al 0-70% añadiendo 472 g de sulfato de amonio por litro de eluido de columna a 4°C. Después de agitar durante 30 minutos, el precipitado se resuspendió en un volumen mínimo de TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) y se aplicó a una columna de filtración en gel TSK G4000W_{XL} equilibrada en TBS. El caudal en la columna era de 0,5 ml/min y se empleó una columna de protección. En alícuotas de <250 μ l, el sedimento de sulfato de amonio resuspendido se inyectó en la columna y las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE con análisis de Western. Las fracciones que contenían sPLS.T7 se combinaron y después se usaron para inmunizar conejos.

Se generaron anticuerpos contra sPLS.T7 de la forma convencional por sensibilización con antígeno y posterior refuerzo durante un periodo de 3 meses. En concreto, se realizó una inmunización primaria mezclando 50 μ g de sPLS.T7 (desnaturalizado por mezcla en SDS al 0,1% y calentamiento durante 10 minutos a 100°C) con adyuvante completo de Freund y se inyectó en cinco sitios subcutáneamente. Los segundos refuerzos (y todos los posteriores) se realizaron mezclando 25 μ g de sPLS.T7 (desnaturalizado por mezcla en SDS al 0,1% y calentamiento durante 10 minutos a 100°C) [12,4 μ g para el tercer refuerzo y refuerzos posteriores] con adyuvante incompleto de Freund e inyectando en dos sitios subcutáneamente (o posteriormente, por vía intramuscular) cada dos semanas. Se realizaron extracciones de sangre de ensayo cada dos semanas para controlar el título de anticuerpos. Cuando el título de anticuerpos alcanzaba un nivel adecuado, se realizaba una extracción de sangre a mayor escala y se preparaba una fracción de suero total. Esta preparación de anticuerpo policlonal se usaba para inhibir la unión específica de células HL60 a células CHO:P-selectina de una forma similar a la descrita en el Ejemplo 4.

Este ensayo empleaba células HL60 marcadas fluorescentemente (marcadas con BCECFAM; éster acetoximetílico de 2',7'-bis-(2-carboximetil)-5-(y-6)-carboxifluoresceína) que se unían a células CHO sembradas en el fondo de placas de microtitulación. Las células HL60 marcadas se preincubaron con sueros que contenían anticuerpo policlonal o con sueros preinmunes ante 30 minutos a 4°C. Después las células se lavaron y se incubaron con las células CHO:P-selectina durante 10 minutos. Después, las placas se lavaron y la fluorescencia se leyó con un lector de placas de microtitulación de fluorescencia. Usando este ensayo, una dilución 1:15 del suero policlonal anti-sPSL.T7 dio como resultado una inhibición esencialmente completa de la unión de células HL60 a CHO:P-selectina. Todavía se observaba una inhibición demostrable de la unión de HL60 a CHO:P-selectina a diluciones de antisuero de 1:150. El suero preinmune no tenía efecto sobre la unión de células HL60 a CHO:P-selectina.

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: GENETICS INSTITUTE, INC.

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: NUEVA PROTEÍNA LIGANDO DE P-SELECTINA

5 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 6

(iv) DIRECCIÓN POSTAL:

(A) DESTINATARIO: Legal Affairs

(B) CALLE: 87 Cambridge Park Drive

(C) CIUDAD: Cambridge

10 (D) ESTADO: MA

(E) PAÍS: Estados Unidos

(F) CÓDIGO POSTAL: 02140

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE SOPORTE: Disquete

15 (B) ORDENADOR: Compatible con PC IBM

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD:

20 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:

(C) CLASIFICACIÓN:

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 07/965.662

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 23-OCT-1992

25 (C) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/112.608

(D) FECHA DE PRESENTACIÓN: 26-AGO-1993

(viii) INFORMACIÓN DEL MANDATARIO/AGENTE:

(A) NOMBRE: McDaniels, Patricia A.

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 33.194

30 (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: GI 5123B-PCT

(ix) INFORMACIÓN POR TELECOMUNICACIONES:

(A) TELÉFONO: (617) 876-1210 Ext. 8405

(B) TELEFAX: (617) 876-5851

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 1:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1649 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

5 (G) TIPO DE CÉLULA: Promielocito

(H) LÍNEA CELULAR: HL60

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: pMT21:PL85

(ix) CARACTERÍSTICA:

10 (A) NOMBRE/CLAVE: 5'UTR

(B) LOCALIZACIÓN: 1..59

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 60..1268

15 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: 3'UTR

(B) LOCALIZACIÓN: 1269..1649

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 1:

```

GCCACTTCTT CTGGGCCAC GAGGCAGCTG TCCCATGCTC TGCTGAGCAC GGTGOTGCC      59
ATG CCT CTG CAA CTC CTC CTG TTG CTG ATC CTA CTG GCC CCT GCC AAC      107
Met Pro Leu Gln Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Gly Pro Gly Asn
  1                    5                    10                    15
ACC TTG CAG CTG TGG GAC ACC TGG GCA GAT GAA GCC GAG AAA GCC TTG      155
Ser Leu Gln Leu Trp Asp Thr Trp Ala Asp Glu Ala Glu Lys Ala Leu
  20                    25                    30
GGT CCC CTG CTT GCC CCG GAC CCG AGA CAG GCC ACC GAA TAT GAG TAC      203
Gly Pro Leu Leu Ala Arg Asp Arg Arg Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr
  35                    40                    45
CTA GAT TAT GAT TTC CTG CCA GAA ACC GAG CCT CCA GAA ATG CTG AGG      251
Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg
  50                    55                    60
AAC ACC ACT GAC ACC ACT CCT CTG ACT GCG CCT GGA ACC CCT GAG TCT      299
Asn Ser Thr Asp Thr Thr Pro Leu Thr Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser
  65                    70                    75                    80
ACC ACT CTG GAG CCT GCT GCA AGG COT TCT ACT GCG CTG GAT CCA CCA      347
Thr Thr Val Glu Pro Ala Ala Arg Arg Ser Thr Gly Leu Asp Ala Gly
  85                    90                    95
GGG GCA GTC ACA GAG CTG ACC ACG GAG CTG GCC AAC ATG GCG AAC CTG      395
Gly Ala Val Thr Glu Leu Thr Thr Glu Leu Ala Asn Met Gly Asn Leu
  100                    105                    110
TCC ACG GAT TCA GCA GCT ATG GAG ATA CAG ACC ACT CAA CCA GCA GCC      443
Ser Thr Asp Ser Ala Ala Met Glu Ile Gln Thr Thr Gln Pro Ala Ala
  115                    120                    125
ACG GAG GCA CAG ACC ACT CCA CTG GCA GCC ACA GAG GCA CAG ACA ACT      491
Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr
  130                    135                    140

```

GCA CTG ACC GCC ACC GAG GCA CAG ACC ACT CCA CTG GCA GCC ACA GAG Arg Leu Thr Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Thr Glu 145 150 155 160	539
GCA CAG ACC ACT CCA CCA GCA GCC ACC GAA GCA CAG ACC ACT CAA CCC Ala Gln Thr Thr Pro Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro 165 170 175	587
ACA GGC CTG GAG GCA CAG ACC ACT GCA CCA GCA GCC ATG GAG GCA CAG Thr Gly Leu Glu Ala Gln Thr Thr Ala Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln 180 185 190	635
ACC ACT GCA CCA GCA GCC ATG GAA GCA CAG ACC ACT CCA CCA GCA GCC Thr Thr Ala Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr Pro Pro Ala Ala 195 200 205	683
ATG GAG GCA CAG ACC ACT CAA ACC ACA GCC ATG GAG GCA CAG ACC ACT Met Glu Ala Gln Thr Thr Thr Thr Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr 210 215 220	731
GCA CCA GAA GCC ACC GAG GCA CAG ACC ACT CAA CCC ACA GCC ACC GAG Ala Pro Glu Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro Thr Ala Thr Glu 225 230 235 240	779
GCA CAG ACC ACT CCA CTG GCA GCC ATG GAG GCC CTG TCC ACA GAA CCC Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Met Glu Ala Leu Ser Thr Glu Pro 245 250 255	827
AGT GCC ACA GAG GCC CTG TCC ATG GAA CCT ACT ACC AAA AGA GGT CTG Ser Ala Thr Glu Ala Leu Ser Met Glu Pro Thr Thr Lys Arg Gly Leu 260 265 270	875
TTC ATA CCC TTT TCT GTG TCC TCT GTT ACT CAC AAG GCG ATT CCC ATG Phe Ile Pro Phe Ser Val Ser Ser Val Thr His Lys Gly Ile Pro Met 275 280 285	923
CCA GCC AGC AAT TTG TCC GTG AAC TAC CCA GTG GCG CCC CCA GAC CAC Ala Ala Ser Asn Leu Ser Val Asn Tyr Pro Val Gly Ala Pro Asp His 290 295 300	971
ATC TCT GTG AAG CAG TGC CTG CTG GCC ATC CTA ATC TTG GCG CTG CTG Ile Ser Val Lys Gln Cys Leu Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Leu Val 305 310 315 320	1019
GCC ACT ATC TTC TTC GTG TGC ACT GTG GTG CTG GCG GTC GCG CTC TCC Ala Thr Ile Phe Phe Val Val Cys Thr Val Val Leu Ala Val Arg Leu Ser 325 330 335	1067
GCC AAG GCC CAG ATG TAC CCC GTG CGT AAT TAC TCC CCC ACC GAG ATG Arg Lys Gly His Met Tyr Pro Val Arg Asn Tyr Ser Pro Thr Glu Met 340 345 350	1115
GTC TGC ATC TCA TCC CTG TTG CCT GAT GCG GGT GAG GCG CCC TCT GCC Val Cys Ile Ser Ser Leu Leu Pro Asp Gly Gly Glu Gly Pro Ser Ala 355 360 365	1163
ACA GCC AAT GCG CGC CTG TCC AAG GCC AAG ACC CCG GCG CTG ACC CCA Thr Ala Asn Gly Gly Leu Ser Lys Ala Lys Ser Pro Gly Leu Thr Pro 370 375 380	1211
GAG CCC AGG GAG GAC CGT GAG GCG GAT GAC CTC ACC CTG CAC AGC TTC Glu Pro Arg Glu Asp Arg Glu Gly Asp Asp Leu Thr Leu His Ser Phe 385 390 395 400	1259
CTC CCT TAGCTCACTC TGCCATCTGT TTTGGCAAGA CCCCACCTCC ACCGGCTCTC Leu Pro	1315
CTGGGCCACC CCTGAGTGCC CAGACCCCAA TCCACAGCTC TGGGCTTCCT CCGAGACCCC	1375
TGGGGATGGG GATCTTCAGG GAAGGAATC TGGCCACCCA AACAGGACAA GAGCAGCCTG	1435
GGCCCAAGCA GACGGGCAAG TGGAGCCACC TCTTTCTCTC CTCGGGGAT GAAGCCACGC	1495
CACATTTGAG CCGAGGTCCA AGGCAGGAGG CCAATTTACTT GAGACAGATT CTCTCCTTTT	1555
TCCTGTCCCC CATCTTCTCT GGGTCCCTCT AACATCTCC ATGGCTCTCC CCGCTTCTCC	1615
TGGTCACTGG AGTCTCTCTC CCATGTACCC AAGG	1649

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 402 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 2:

Met Pro Leu Gln Leu Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Gly Pro Gly Asn
 1 5 10 15

Ser Leu Gln Leu Trp Asp Thr Trp Ala Asp Glu Ala Glu Lys Ala Leu
 20 25 30

Gly Pro Leu Leu Ala Arg Asp Arg Arg Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr
 35 40 45

Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg
 50 55 60

Asn Ser Thr Asp Thr Thr Pro Leu Thr Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser
 65 70 75 80

Thr Thr Val Glu Pro Ala Ala Arg Arg Ser Thr Gly Leu Asp Ala Gly
 85 90 95

Gly Ala Val Thr Glu Leu Thr Thr Glu Leu Ala Asn Met Gly Asn Leu
 100 105 110

Ser Thr Asp Ser Ala Ala Met Glu Ile Gln Thr Thr Gln Pro Ala Ala
 115 120 125

Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr
 130 135 140

Arg Leu Thr Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Thr Glu
 145 150 155 160

Ala Gln Thr Thr Pro Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro
 165 170 175

Thr Gly Leu Glu Ala Gln Thr Thr Ala Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln
 180 185 190

Thr Thr Ala Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr Pro Pro Ala Ala
 195 200 205

Met Glu Ala Gln Thr Thr Gln Thr Thr Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr
 210 215 220

Ala Pro Glu Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro Thr Ala Thr Glu
 225 230 235 240

Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Met Glu Ala Leu Ser Thr Glu Pro
 245 250 255

Ser Ala Thr Glu Ala Leu Ser Met Glu Pro Thr Thr Lys Arg Gly Leu
 260 265 270

Phe Ile Pro Phe Ser Val Ser Ser Val Thr His Lys Gly Ile Pro Met
 275 280 285

Ala Ala Ser Asn Leu Ser Val Asn Tyr Pro Val Gly Ala Pro Asp His
 290 295 300

Ile Ser Val Lys Gln Cys Leu Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Leu Val
 305 310 315 320

Ala Thr Ile Phe Phe Val Cys Thr Val Val Leu Ala Val Arg Leu Ser
 325 330 335

Arg Lys Gly His Met Tyr Pro Val Arg Asn Tyr Ser Pro Thr Glu Met
 340 345 350

Val Cys Ile Ser Ser Leu Leu Pro Asp Gly Gly Glu Gly Pro Ser Ala
 355 360 365

Thr Ala Asn Gly Gly Leu Ser Lys Ala Lys Ser Pro Gly Leu Thr Pro
 370 375 380

Glu Pro Arg Glu Asp Arg Glu Gly Asp Asp Leu Thr Leu His Ser Phe
 385 390 395 400

Leu Pro

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1239 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

5 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc (sintético)

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

10 (G) TIPO DE CÉLULA: placenta

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..1239

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 3:

ATG	CCT	CTG	CAA	CTC	CTC	CTG	TTG	CTG	ATC	CTA	CTG	GGC	CCT	GGC	AAC	48
Met	Pro	Leu	Gln	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	Gly	Pro	Gly	Asn	
1				5					10					15		
AGC	TTG	CAG	CTG	TGG	GAC	ACC	TGG	GCA	GAT	GAA	CCC	GAG	AAA	GCC	TTG	96
Ser	Leu	Gln	Leu	Trp	Asp	Thr	Trp	Ala	Asp	Glu	Ala	Glu	Lys	Ala	Leu	
			20					25					30			
GGT	CCC	CTG	CCT	GCC	CGG	GAC	CGG	AGA	CAG	GCC	ACC	GAA	TAT	GAG	TAC	144
Gly	Pro	Leu	Leu	Ala	Arg	Asp	Arg	Arg	Gln	Ala	Thr	Glu	Tyr	Glu	Tyr	
			35				40					45				
CTA	GAT	TAT	GAT	TTC	CTG	CCA	GAA	ACG	GAG	CCT	CCA	GAA	ATG	CTG	ACG	192
Leu	Asp	Tyr	Asp	Phe	Leu	Pro	Glu	Thr	Glu	Pro	Pro	Glu	Met	Leu	Arg	
	50					55					60					
AAC	AGC	ACT	GAC	ACC	ACT	CCT	CTG	ACT	CGG	CCT	GGA	ACC	CCT	GAG	TCT	240
Asn	Ser	Thr	Asp	Thr	Thr	Pro	Leu	Thr	Gly	Pro	Gly	Thr	Pro	Glu	Ser	
	65				70					75					80	
ACC	ACT	GTG	GAG	CCT	GCT	GCA	AGG	CGT	TCT	ACT	GGC	CTG	GAT	GCA	GGA	288
Thr	Thr	Val	Glu	Pro	Ala	Ala	Arg	Arg	Ser	Thr	Gly	Leu	Asp	Ala	Gly	
				85					90					95		

15

GGG GCA GTC ACA GAG CTG ACC ACC GAG CTG GCC AAC ATG GGG AAC CTG Gly Ala Val Thr Glu Leu Thr Thr Glu Leu Ala Asn Met Gly Asn Leu 100 105 110	336
TCC ACC GAT TCA GCA GCT ATG GAG ATA CAG ACC ACT CAA CCA GCA GCC Ser Thr Asp Ser Ala Ala Met Glu Ile Gln Thr Thr Gln Pro Ala Ala 115 120 125	384
ACG GAG GCA CAG ACC ACT CAA CCA GTG CCC ACC GAG GCA CAG ACC ACT Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro Val Pro Thr Glu Ala Gln Thr Thr 130 135 140	432
CCA CTG GCA GCC ACA GAG GCA CAG ACA ACT CGA CTG ACC GCC ACC GAG Pro Leu Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Arg Leu Thr Ala Thr Glu 145 150 155 160	480
GCA CAG ACC ACT CCA CTG GCA GCC ACA GAG GCA CAG ACC ACT CCA CCA Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Pro 165 170 175	528
GCA GCC ACC GAA GCA CAG ACC ACT CAA CCC ACA GCC CTG GAG GCA CAG Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro Thr Gly Leu Glu Ala Gln 180 185 190	576
ACC ACT GCA CCA GCA GCC ATG GAG GCA CAG ACC ACT GCA CCA CCA GCC Thr Thr Ala Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr Ala Pro Ala Ala 195 200 205	624
ATG GAA GCA CAG ACC ACT CCA CCA GCA GCC ATG GAG GCA CAG ACC ACT Met Glu Ala Gln Thr Thr Pro Pro Ala Ala Met Ala Gln Thr Thr 210 215 220	672
CAA ACC ACA GCC ATG GAG GCA CAG ACC ACT GCA CCA GAA GCC ACC GAG Gln Thr Thr Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr Ala Pro Glu Ala Thr Glu 225 230 235 240	720
GCA CAG ACC ACT CAA CCC ACA GCC ACC GAG GCA CAG ACC ACT CCA CTG Ala Gln Thr Thr Gln Pro Thr Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Leu 245 250 255	768
GCA GCC ATG GAG GCC CTG TCC ACA GAA CCC AGT GCC ACA GAG GCC CTG Ala Ala Met Glu Ala Leu Ser Thr Thr Glu Pro Ser Ala Thr Glu Ala Leu 260 265 270	816
TCC ATG GAA CCT ACT ACC AAA AGA GGT CTG TTC ATA CCC TTT TCT GTG Ser Met Glu Pro Thr Thr Lys Arg Gly Leu Phe Ile Pro Phe Ser Val 275 280 285	864
TCC TCT GTT ACT CAC AAG GCG ATT CCC ATG GCA GCC AGC AAT TTG TCC Ser Ser Val Thr His Lys Gly Ile Pro Met Ala Ala Ser Asn Leu Ser 290 295 300	912
GTC AAC TAC CCA GTG GGG GCC CCA GAC CAC ATC TCT GTG AAG CAG TGC Val Asn Tyr Pro Val Val Gly Ala Pro Asp His Ile Ser Val Lys Gln Cys 305 310 315 320	960
CTG CTG GCC ATC CTA ATC TTG GCG CTG GTG GCC ACT ATC TTC TTC GTG Leu Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Leu Val Ala Thr Ile Phe Phe Val 325 330 335	1008
TGC ACT GTG GTG CTG GCG GTC CCC CTC TCC CGC AAG GGC CAC ATG TAC Cys Thr Val Val Leu Ala Val Arg Leu Ser Arg Lys Gly His Met Tyr 340 345 350	1056
CCC GTG COT AAT TAC TCC CCC ACC GAG ATG GTC TGC ATC TCA TCC CTG Pro Val Arg Asn Tyr Ser Pro Thr Glu Met Val Cys Ile Ser Ser Leu 355 360 365	1104
TTG CCT GAT GGG GGT GAG GGG CCC TCT GCC ACA GCC AAT GGG GCC CTG Leu Pro Asp Gly Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Ala Asn Gly Gly Leu 370 375 380	1152
TCC AAG CCC AAG AGC CCG GCC CTG ACG CCA GAG CCC AAG GAG GAC CGT Ser Lys Ala Lys Ser Pro Gly Leu Thr Pro Pro Glu Pro Arg Glu Asp Arg 385 390 395 400	1200
GAG GCG GAT GAC CTC ACC CTG CAC AGC TTC CTC CCT TAG Glu Gly Asp Asp Leu Thr Leu His Ser Phe Leu Pro 405 410	1239

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 412 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 4:

Met Pro Leu Gln Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Gly Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Gln Leu Trp Asp Thr Trp Ala Asp Glu Ala Glu Lys Ala Leu
20 25 30

Gly Pro Leu Leu Ala Arg Asp Arg Arg Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr
35 40 45

Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg
50 55 60

Asn Ser Thr Asp Thr Thr Pro Leu Thr Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser
65 70 75 80

Thr Thr Val Glu Pro Ala Ala Arg Arg Ser Thr Gly Leu Asp Ala Gly
85 90 95

Gly Ala Val Thr Glu Leu Thr Thr Glu Leu Ala Asn Met Gly Asn Leu
100 105 110

Ser Thr Asp Ser Ala Ala Met Glu Ile Gln Thr Thr Gln Pro Ala Ala
115 120 125

Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro Val Pro Thr Glu Ala Gln Thr Thr
 130 135 140

Pro Leu Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Arg Leu Thr Ala Thr Glu
 145 150 155 160

Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro Thr Gly Leu Glu Ala Gln
 180 185 190

Thr Thr Ala Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr Ala Pro Ala Ala
 195 200 205

Met Glu Ala Gln Thr Thr Pro Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr
 210 215 220

Gln Thr Thr Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr Ala Pro Glu Ala Thr Glu
 225 230 235 240

Ala Gln Thr Thr Gln Pro Thr Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Leu
 245 250 255

Ala Ala Met Glu Ala Leu Ser Thr Glu Pro Ser Ala Thr Glu Ala Leu
 260 265 270

Ser Met Glu Pro Thr Thr Lys Arg Gly Leu Phe Ile Pro Phe Ser Val
 275 280 285

Ser Ser Val Thr His Lys Gly Ile Pro Met Ala Ala Ser Asn Leu Ser
 290 295 300

Val Asn Tyr Pro Val Gly Ala Pro Asp His Ile Ser Val Lys Gln Cys
 305 310 315 320

Leu Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Leu Val Ala Thr Ile Phe Phe Val
 325 330 335

Cys Thr Val Val Leu Ala Val Arg Leu Ser Arg Lys Gly His Met Tyr
 340 345 350

Pro Val Arg Asn Tyr Ser Pro Thr Glu Met Val Cys Ile Ser Ser Leu
 355 360 365

Leu Pro Asp Gly Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Ala Asn Gly Gly Leu
 370 375 380

Ser Lys Ala Lys Ser Pro Gly Leu Thr Pro Glu Pro Arg Glu Asp Arg
 385 390 395 400

Glu Gly Asp Asp Leu Thr Leu His Ser Phe Leu Pro
 405 410

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 2151 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(vii) FUENTE INMEDIATA:

- (B) CLON: pacesol

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 5:

```

ATGGAGCTGA GGCCTGCTT GCTATGGGTG GTAGCAGCAA CAGGAACCTT GGTCTGCTA    60
GCAGCTGATG CTCAGGGCCA GAAGGTCTTC ACCAACAGCT GGGCTGTGGC CATCCCTGGA    120
GGCCGAGCGG TGCCCAACAG TGTGGCAGCG AACCATGGGT TCCTCACCTT GGGCCAGATC    180
TTCCGGGACT ATTACCACTT CTGGCATOGA GGAOTGACGA AGCGGTCCCT GTCCCTCAC    240
CGCCCGGGC ACAGCCGGCT GCAGAGGGAG CCTCAGTAC AGTGGCTGGA ACAGCAGGTG    300
GCAAAGCGAC GGACTAAACG GGACGTGTAC CAGGAGCCCA CAGACCCCAA GTTTCCTCAG    360
CAGTGGTACC TGTCTGGTGT CACTCAGCGG GACCTGAATG TGAGGCGGC CTGGGCGCAG    420
GGCTACACAG GGCACGGCAT TGTGGTCTCC ATTCTGGACG ATGCCATCGA GAAGAACCAC    480
CCGCACTTGG CAGGCAATTA TGATCCTGGG GCCAGTTTGG ATGTCAATGA CCAGGACCTT    540
GACCCCCAGG CTGGGTACAG ACAGTGAAT GACAACAGGC ACCCCACACG GTGTCCGGGG    600
GAAGTGGCTG CGTGGCCAA CAACGGTGTG TGTGGTGTAG GTGTGGCCTA CAACGCCCGC    660
ATTGGAGGGG TGCGCATGCT GGATGGCCAG GTGACAGATG CAGTGGAGGC ACGCTGGCTG    720
GGCCTGAACC CCAACCACAT CCACATCTAC AGTCCAGCTT GGGGCCCGGA GGATGAGGGC    780
AAGACAGTGG ATGGCCAGC CCGCCTGGCC GAGGAGGCTT TCTTCCGTGG GGTTAGCCAG    840
GGCCGAGGGG GGTGGGCTC CATCTTTGTC TGGCCCTCGG GGAACGGGGG CCGGGAACAT    900
GACAGCTGCA ACTGCGAGCG CTACACCAAC AGTATCTACA CGCTGTCCAT CAGCAGCGCC    960
ACGCAGTTTG GCAACGTGCC GTGGTACAGC GAGGCCTGCT CCTCCACACT GCCCAGGACC   1020
    
```

10

TACAGCAGTG GCAACCAGAA TGAGAAGCAQ ATCGTGACGA CTGACTTGGG GCAGAAGTCC 1080
 ACGGAGTCTC ACACGGGCAC CTCAGCCTCT GCCCCCTAG CAGCCGGCAT CATTGCTCTC 1140
 ACCCTGGAGG CCAATAAGAA CCTCACATGG CCGGACATGC AACACCTGGT GGTACAGACC 1200
 TCGAAGCCAG CCCACCTCAA TGCCAACGAC TGGCCCAACA ATGGTGTGGG CCGGAAGTG 1260
 AGCCACTCAT ATGGCTACGG GCTTTTGGAC GCAGGGGCCA TGCTGGCCTT GCCCCAGAA 1320
 TGGACCACAG TGGCCCCCA GCGGAAGTGC ATCATCGACA TCCTCACGA GCCCAAGAC 1380
 ATCGGAAAC GGCTCGAGGT GCGGAAGACC GTGACCGCTT GCCTGGGCGA GCCCAACCAC 1440
 ATCACTCGGC TGGAGCAGCC TCAGGCGCGG CTCACCTGT CCTATAATCG CCGTGGCGAC 1500
 CTGGCCATCC ACCTGGTCAG CCCCATGGGC ACCCCCTCCA CCGTCTGGC AGCCAGGCGA 1560
 CATGACTACT CCGCAGATGG GTTTAATGAC TGGGCCITCA TGACAACCTA TTCTGGGAT 1620
 GAGGATCCCT CTGGCGAGTG GGTCCCTAGAG ATTGAAAACA CCAGCGAAGC CAACAACCTAT 1680
 GGGACGCTGA CCAAGTTCAC CCTCGTACTC TATGGCACCG CCCCTGAGGG GCTGCCCGTA 1740
 CCTCCAGAAA GCAGTGGCTG CAAGACCCTC ACGTCCAGTC AGGCCTGTGT GGTGTGCGAG 1800
 GAAGGCTTCT CCGTCACCA GAAGAGCTGT GTCCAGCACT GCCCTCCAGG CTTCGCCCCC 1860
 CAAGTCTCG ATACGCACTA TAGCACCGAG AATGACCTGG AGACCATCG GCCCAGCGTC 1920
 TGGGCCCCCT GCCACGCCTC ATGTGOCACA TGCCAGGGGC CCGCCCTEAC AGACTGCCTC 1980
 AGCTGCCCA GCCACGCCTC CTTGGACCTT GTGGAGCAGA CTTGCTCCCG GCAAAGCCAG 2040
 AGCAGCCGAG AGTCCCGGCC ACAGCAGCAG CCACTCGGC TGCCCCCGGA GGTGGAGGCG 2100
 GGGCAACGGC TGCGGGCAGG GCTGTGCCC TCACACCTGC CTGAGTATG A 2151

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 6

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1591 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Homo sapiens

(vii) FUENTE INMEDIATA:

- (B) CLON: sPSL.Fc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 6:

ATGCTCTGG AACTCCTCCT GTTGTGATC CTACTGGGCC CTGGCAACAG CTTGCAGCTG 60
 TGGACACCT GGGCAGATGA AGCCGAGAAA GCCTTGGGTC CCTGCTTGC CCGGGACCGG 120
 AGACAGGCCA CCGAATATGA GTACCTAGAT TATGATTTCC TGCCAGAAAC GGAGCCTCCA 180

GAAATGCTGA GGAACAGCAC TGACACCACT CCTCTGACTG GGCCTGGAAC CCCTGAGTCT 240
 ACCACTGTGG AGCCTGCTGC AAGGCGTTCT ACTGGCCTGG ATGCAGGAGG GCCAGTCACA 300
 GAGCTGACCA CCGAGCTGGC CAACATGGGG AACCTGTCCA CGGATTTCAGC AGCTATGGAG 360
 ATACAGACCA CTCACCCAGC AGCCACGGAG GCACAGACCA CTCCACTGGC AGCCACAGAG 420
 GCACAGACAA CTCGACTGAC GGCACGGAG GCACAGACCA CTCCACTGGC AGCCACAGAG 480
 GCACAGACCA CTCACCCAGC AGCCACGGAA GCACAGACCA CTCACCCAC AGGCCTGGAG 540
 GCACAGACCA CTCACCCAGC AGCCATGGAG GCACAGACCA CTCACCCAGC AGCCATGGAA 600
 GCACAGACCA CTCACCCAGC AGCCATGGAG GCACAGACCA CTCACCCAC AGCCATGGAG 660
 GCACAGACCA CTCACCCAGC AGCCACGGAG GCACAGACCA CTCACCCAC AGCCACGGAG 720
 GCACAGACCA CTCCACTGGC AGCCATGGAG GCCCTGTCCA CAGAACCACG TCCACAGAG 780
 GCCCTGTCCA TGGAACTAC TACCAAAGA GGTCTGTTCA TACCTTTTC TGTCCTCT 840
 GTTACTCACA AGGCGATTCC CATGGCAGCC AGCAATTTGT CGTCTCTGG GCCGAGTCT 900
 AGAGACAAA CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA 960
 GTCTTCTCTT TCCCCCAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCTGAGGTC 1020
 ACATGCGTGG TGGTGGAGT GAGCCACGAA GACCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG 1080
 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCCGGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG 1140
 TACCGTGTGG TCAGCGTCTT CACCGTCTG CACCAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC 1200
 AAGTGCAGG TCTCCARCAA AGCCCTOCCA GTCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC 1260
 AAAGGGCAGC CCGGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGA GGAGATGACC 1320
 AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCTGTGC AAAGGCTTCT ATCCCAAGCA CATCGCCGTG 1380
 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGGCTCC CTGCTGGAC 1440
 TCGAGCGCT CTTCTTCTT CTATAGCAAG CTCACCTGG ACAGAGCAG GTGGCAGCAG 1500
 GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGAGAG 1560
 AGCCTCTCCC TGTCCCCGGG TAAATAG 1591

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de proteína ligando de P-selectina que tiene actividad de ligando de P-selectina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
 - a) del aminoácido 21 al aminoácido 54 de la SEC ID N°: 1
 - 5 b) del aminoácido 55 al aminoácido 127 de la SEC ID N°: 1
 - c) del aminoácido 128 al aminoácido 267 de la SEC ID N°: 1
 - d) del aminoácido 268 al aminoácido 308 de la SEC ID N°: 1
 - e) del aminoácido 309 al aminoácido 333 de la SEC ID N°: 1
 - f) del aminoácido 334 al aminoácido 402 de la SEC ID N°: 1
 - 10 g) del aminoácido 43 al aminoácido 56 de la SEC ID N°: 1
 - h) del aminoácido 1 al aminoácido 310 de la SEC ID N°: 1
2. El fragmento de la proteína ligando de P-selectina que comprende del aminoácido 43 al aminoácido 56 de la SEC ID N°: 1, en el que una o más de las tirosinas en el aminoácido 46, aminoácido 48 y/o aminoácido 51 está sulfatada.
- 15 3. El ligando de P-selectina de la reivindicación 1, en el que el ligando de P-selectina está en forma lineal.
4. El fragmento de ligando P-selectina de la reivindicación 1, en el que el ligando de P-selectina está en forma cíclica.
5. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica uno de los fragmentos de ligando de P-selectina de la reivindicación 1.
- 20 6. Un anticuerpo que reacciona específicamente con el ligando de P-selectina, en el que la secuencia de la proteína ligando de P-selectina consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
 - a) del aminoácido 42 al aminoácido 56 de la SEC ID N°: 1; y
 - b) del aminoácido 127 al aminoácido 138 de la SEC ID N°: 1.
- 25 7. Un plásmido que codifica un ligando de P-selectina que comprende una secuencia de acuerdo con la SEC ID N°: 1.
8. El plásmido de la reivindicación 7, en el que dicho plásmido es pMT21:PL85.
9. Un anticuerpo de la reivindicación 6 que reacciona específicamente con la proteína ligando de P-selectina, para usarse para el tratamiento de una afección caracterizada por la adhesión mediada por P-selectina.
- 30 10. Uso de un anticuerpo de la reivindicación 6 que reacciona específicamente con la proteína ligando de P-selectina, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una afección caracterizada por una adhesión mediada por P-selectina.
11. Un anticuerpo de la reivindicación 6 que reacciona específicamente con proteína ligando de P-selectina para usar para el tratamiento o diagnóstico de enfermedades inflamatorias o cáncer.
- 35 12. Uso de un anticuerpo de la reivindicación 6, que reacciona específicamente con proteína ligando de P-selectina, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o diagnosticar enfermedades inflamatorias o cáncer.
13. El anticuerpo de las reivindicaciones 9 u 11 para el uso especificado en la presente memoria, o el uso de las reivindicaciones 10 ó 12, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
14. Una proteína de fusión que comprende:
 - 40 a) una primera secuencia de aminoácidos seleccionada de: del aminoácido 21 al aminoácido 54 de la SEC ID N°: 1; del aminoácido 55 al aminoácido 127 de la SEC ID N°: 1; del aminoácido 128 al aminoácido 267 de la SEC ID N°: 1; del aminoácido 268 al aminoácido 308 de la SEC ID N°: 1; del aminoácido 309 al aminoácido 333 de la SEC ID N°: 1; del aminoácido 334 al aminoácido 402 de la SEC ID N°: 1; del aminoácido 43 al aminoácido 56 de la SEC ID N°: 1; y del aminoácido 42 al aminoácido 295 de la SEC ID N°: 1; y
 - 45 b) una segunda secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de una porción Fc de una inmunoglobulina.
15. La proteína de fusión de la reivindicación 14, en la que la primera secuencia de aminoácidos comprende del aminoácido 43 al aminoácido 56 de la SEC ID N°: 1.

16. La proteína de fusión de la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en la que la inmunoglobulina es una molécula de IgG.
17. La proteína de fusión de la reivindicación 16, en la que la IgG es IgG₁.
- 5 18. La proteína de fusión de la reivindicación 1 o la reivindicación 15, en la que la inmunoglobulina es una molécula de IgM.
19. La proteína de fusión de la reivindicación 15, en la que una o más tirosinas en el aminoácido 46, aminoácido 48 y/o aminoácido 51 de la primera secuencia de aminoácidos están sulfatadas.
20. Un ADN que codifica la proteína de fusión de la reivindicación 14 o la reivindicación 15.
21. Un plásmido que comprende un ADN que codifica una proteína de fusión de ligando de P-selectina soluble-Fc.
- 10 22. El plásmido de la reivindicación 21, en el que el plásmido es pED.PSL.Fc.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

5

Documentos de patentes citados en la descripción

- Patente de Estados Unidos Nº 4.675.285
- WO 92/09698
- U.S. de Nº de Serie 07/885.972.
- 10 • WO 92/09698
- U.S. de Nº Serie 07/885.972,
- Patente de Estados Unidos Nº 4.235.871
- Patente de Estados Unidos Nº 4.501.728
- Patente de Estados Unidos Nº 4.837.028
- 15 • Patente de Estados Unidos Nº 4.737.323.
- Patente de Estados Unidos Nº U.S. 4.752.569

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- Moore et al., J. Cell Biol. 118, 445-456 (1992)
- 20 • H. U. Saragovi, et al., Bio/Technology 10, 773-778 (1992)
- R. S. McDowell, et al., J. Amer. Chem. Soc. 114, 9245-9253 (1992)
- S. J. Collins, et al., Nature 270, 347-349 (1977)
- Kaufman et al., Nucleic Acids Res. 19, 4485-4490 (1991)
- R. Kaufman, Methods in Enzymology 185, 537-566 (1990)
- 25 • A. M. W. van den Ouweland et al., Nucl. Acids Res. 18, 664 (1990)
- R. P. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963)
- J. L. Krstenansky, et al, FEBS Lett. 211, 10 (1987)
- R. Kaufman et al, J. Mol. Cell. Biol. 9, 946-958 (1989)
- 30 • J. Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pl. 90 (1989)
- B. Hirts, J. Mol. Biol., 26, 365-369 (1967)
- M. Horwitz et al, Mol. Appl. Genet., 2: 147-149, (1983)
- L. Sompeyrac y K. Dana, Proc. Natl. Acad. Sci., 78: 7575-7578 (1981)
- M. Lopata et al, Nucleic Acid Res, 12: 5707-5717, (1984)
- 35 • H. Luthman y G. Magnuson, Nucleic Acids Res., 11: 1295-1308, (1983)
- G. Larsen et al, J. Biol. Chem 267: 11104-11110, (1992)
- Campbell, C. y Stanley, P. Cell 35: 303-309 (1983)
- Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220 (1980)
- Goding, J. W. J. Immunol. Methods 10: 61-66 (1976)

- Kaufman, et al, PNAS (USA) 83: 3136-3140 (1986)
 - Aruffo et al. Cell 67, 35-44 (1991)
 - Larsen et al., J. Biol. Chem. 267, 11104-11110 (1992)
 - Maina, C. V. et al., Gene 74, 365-373 (1988)
- 5
- Riggs, P., en Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausebel et al., Eds., Greene Associates/Wiley Interscience (Nueva York, 1990) capitulo 16.6.