

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 678**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

A61K 35/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2001 E 09180380 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2174954**

54 Título: **Polipéptidos ligandos de e-selectina/l-selectina de células hematopoyéticas y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

18.10.2000 US 240987 P

10.06.2001 US 297474 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2016

73 Titular/es:

SACKSTEIN, ROBERT (100.0%)

26 Fox Run Road

Sudbury MA 01776, US

72 Inventor/es:

SACKSTEIN, ROBERT

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 576 678 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos ligandos de e-selectina/l-selectina de células hematopoyéticas y métodos de uso de los mismos

5 Declaración como investigación subvencionada federalmente

La presente invención se realizó con la ayuda del gobierno de Estados Unidos con las becas para sanidad NHLBIRO1 HL60528 y CA84156. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

10 Campo de la invención

La invención proporciona composiciones y métodos para identificar células madre y tratar trastornos hematopoyéticos (por ejemplo, leucemia), cáncer, trastornos inflamatorios y trastornos susceptibles de tratar con células madre (por ejemplo, infarto de miocardio, enfermedad de Parkinson, diabetes o ictus).

15 Antecedentes de la invención

La citoarquitectura especializada del microambiente hematopoyético está creada por interacciones discretas de adherencia célula-célula y célula-matriz extracelular, que están estrechamente reguladas por la expresión de moléculas de adhesión específica de linaje. Las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) más tempranas se caracterizan por la ausencia de marcadores específicos de linaje y la expresión de la molécula de superficie CD34. Diversas moléculas de adhesión se expresan en las CPH, incluyendo CD44 (el "receptor del ácido hialurónico", también conocido como H-CAM), miembros de la superfamilia de las integrinas (por ejemplo, LFA-1, VLA-4) y de las inmunoglobulinas (por ejemplo, ICAM1), y un miembro de la familia de las selectinas, la selectina-L. La selectina-L (CD62L) es una proteína de unión a carbohidratos dependiente del calcio, miembro de una familia de moléculas de adhesión que también incluye la selectina-E (CD62E), expresada en el endotelio vascular activado, y la selectina-P (CD62P), que se encuentra tanto en las plaquetas activadas como en las células endoteliales. Las interacciones mediadas por las selectinas son cruciales, no solo para el reclutamiento rápido y eficaz de los leucocitos a los lugares de lesión, sino para la migración específica de tejido en equilibrio como se ilustra en: (1) migración de los linfocitos a los ganglios linfáticos periféricos, (2) tropismo cutáneo de las células T y (3) la entrada de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) en la médula ósea.

Sumario de la invención

En el presente documento, los inventores describen un nuevo polipéptido glucosilado expresado en células progenitoras hematopoyéticas humanas normales y en blastos leucémicos llamado ligando de selectina E/selectina L de las células hematopoyéticas (HCELL). Los polipéptidos de HCELL también se denominan en el presente documento "KG1a CD44". HCELL es una nueva forma glucosilada de CD44 que contiene N-glicanos fucosilados y sialilados que reaccionan con HECA-452. El polipéptido HCELL es un ligando tanto de la selectina-L como de la selectina-E.

La invención se refiere a una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende un polipéptido glicosilado, comprendiendo dicho polipéptido glicosilado una cadena principal del polipéptido CD44 que muestra glicanos sialilados, fucosilados y se une a la E-selectina y a la L-selectina.

La invención también se refiere a una población de células, en la que dichas células son células madre, células progenitoras hematopoyéticas o células de leucocitos para su uso en el tratamiento de trastornos hematopoyéticos, trastornos inflamatorios, trastornos genéticos, cáncer o trastornos susceptibles de tratamiento con una célula madre, teniendo dichas células un polipéptido glicosilado, comprendiendo dicho polipéptido glicosilado comprende una cadena principal del polipéptido CD44 que muestra glicanos sialilados, fucosilados que se unen E-selectina y a L-selectina, teniendo la población un mayor nivel de expresión del polipéptido glicosilado en relación con poblaciones nativas de células de ese tipo, con la condición de que la población no es una población de células madre embrionarias.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de inmunoglobulina y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de inmunoglobulina y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, cáncer o un trastorno hematopoyético en un sujeto.

En el presente documento también se describe un método para identificar células madre poniendo en contacto una población celular a estudio con uno o más agentes que se unen específicamente a HCELL en condiciones suficientes para formar un complejo entre el agente y la célula madre. El complejo se detecta y si está presente indica que la célula es una célula madre. Los agentes apropiados incluyen un anticuerpo anti-CD44 o un anticuerpo con la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal HECA-452.

Una célula madre también se identifica proporcionando un polipéptido de selectina, por ejemplo, E-selectina o L-selectina, inmovilizado en una fase sólida y poniendo en contacto la fase sólida con una muestra de fluido que contiene una suspensión de células de ensayo. La fase sólida se pone en contacto con la muestra de fluido y la tensión de corte se alcanza en la superficie de la fase sólida. La célula madre se identifica mediante la observación de las células que se adhieren a la fase sólida. La célula de ensayo puede ser, por ejemplo, de sangre o de médula ósea.

Asimismo, los inventores describen diversos métodos para aislar una célula madre (por ejemplo, una célula madre pluripotencial) de una población de células. Una célula madre se aísla poniendo en contacto una población de células con uno o más agentes que se unen específicamente al polipéptido HCELL en condiciones suficientes para formar un complejo entre los agentes y la célula madre. La formación del complejo se detecta y se retira de la población de células, aislando de esta forma la célula madre de la población celular. Adicionalmente, el complejo de célula madre/agente se rompe.

Como alternativa, una célula madre se aísla proporcionando un polipéptido de selectina, por ejemplo, E-selectina o L-selectina, inmovilizado en una fase sólida y poniendo en contacto la fase sólida con una muestra de fluido que contiene una suspensión de células. La fase sólida se pone en contacto con la muestra de fluido de modo que la tensión de corte se alcanza en la superficie de la fase sólida. Las células madre se aíslan recuperando las que están adheridas a la fase sólida.

Asimismo, los inventores describen métodos para tratar trastornos hematopoyéticos, cáncer y trastornos susceptibles de tratamiento con células madre (es decir, terapia con células madre) en mamíferos, lo que incluye administrar al mamífero un compuesto que comprende las células aisladas de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

Asimismo, los inventores describen un método para aumentar la afinidad de una célula por la E-selectina y/o L-selectina, proporcionando una célula y poniendo en contacto la célula con uno o más agentes que aumenten la expresión o actividad del polipéptido HCELL en la superficie celular, aumentando de este modo la afinidad de la célula por la E-selectina y/o L-selectina. Los agentes adecuados incluyen por ejemplo, un ácido nucleico que codifica CD44, una glucosiltransferasa o un polipéptido glucosidasa.

Asimismo, los inventores describen métodos para aumentar el potencial de injerto de una célula madre, proporcionando una célula madre y poniendo en contacto la célula madre con uno o más agentes que aumentan la expresión en la superficie celular o la actividad de un polipéptido HCELL, aumentando de este modo el potencial de injerto de la célula madre.

Como alternativa, el potencial de injerto de una población celular se incrementa proporcionando un polipéptido de selectina, por ejemplo, E-selectina o L-selectina, inmovilizado en una fase sólida y poniendo en contacto la fase sólida con una muestra de fluido que contiene una población celular. La fase sólida se pone en contacto con la muestra de fluido y la tensión de corte se alcanza en la superficie de la fase sólida. Las células que se adhieren a la fase sólida se recuperan.

Los niveles de células madre injertadas en un sujeto, por ejemplo ser humano, se aumentan administrando a un sujeto un agente que incrementa la expresión en la superficie celular de un polipéptido HCELL en el sujeto. Los agentes adecuados incluyen por ejemplo, un ácido nucleico que codifica CD44, una glucosiltransferasa o un polipéptido glucosidasa. Como alternativa, los niveles de células madre injertadas en un sujeto se incrementan administrando al sujeto un compuesto que contiene las células aisladas de acuerdo a los métodos descritos anteriormente.

Los inventores también describen métodos para tratar trastornos hematopoyéticos, por ejemplo leucemia, en un sujeto. El trastorno hematopoyético se trata administrando al sujeto un agente que disminuye la expresión en la superficie celular de un polipéptido HCELL en el sujeto. Como alternativa, el trastorno hematopoyético se trata tomando sangre del sujeto y poniendo la sangre en contacto con uno o más agentes que se unen específicamente al polipéptido HCELL en las condiciones necesarias para formar un complejo entre los agentes y una célula sanguínea. El complejo se detecta, si está presente, y se retira de la sangre. La sangre se reintroduce en el sujeto.

Adicionalmente, un trastorno hematopoyético se trata colocando la sangre del sujeto y un polipéptido selectina, por ejemplo E-selectina o L-selectina inmovilizados en una fase sólida y poniendo en contacto la fase sólida con la sangre. La fase sólida se pone en contacto con la muestra de sangre de modo que la tensión de corte se alcanza en la superficie de la fase sólida. Después, la sangre se reintroduce en el sujeto.

Además, el trastorno hematopoyético se trata administrando al sujeto un agente que se une específicamente a la glucoproteína HCELL.

Los inventores también describen un método de tratamiento de un trastorno inflamatorio en un sujeto, mediante la

administración a un sujeto de una glicoproteína de HCELL o fragmento de la misma.

Los inventores también describen un método para diagnosticar o determinar la susceptibilidad de un sujeto a padecer un trastorno hematológico, poniendo en contacto una población de células derivada del sujeto con uno o más agentes que se unen específicamente a una glucoproteína HCELL en las condiciones necesarias para formar un complejo entre el agente y la célula, y detectar el complejo. La presencia del complejo indica la presencia de o la susceptibilidad del sujeto a sufrir un trastorno hematológico.

Adicionalmente, los inventores describen un método para determinar el pronóstico o la eficacia del tratamiento de un trastorno hematológico en un sujeto, poniendo en contacto una población de células derivada del sujeto con uno o más agentes que se unen específicamente a una glucoproteína HCELL en las condiciones necesarias para formar un complejo entre el agente y la célula, y detectar el complejo.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la presente invención se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria descriptiva, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no están destinados a ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

La figura 1A es una fotografía de una transferencia Western que muestra la expresión de epítomos reactivos a HECA-452 en varias líneas celulares hematopoyéticas humanas.

La figura 1B es un gráfico de barras que muestra la adherencia y rodamiento de las líneas celulares hematopoyéticas (tensión de cizalladura de 2, 8 dinas/m²) sobre monocapas fijadas con glutaraldehído. Los datos se representan como la media $\pm$ SD. El rodamiento de las células CHO-E por campo X 5 campos, mínimo de tres experimentos.

La figura 2 es un gráfico de barras que muestra el rodamiento de las células hematopoyéticas humanas sobre células endoteliales de la médula ósea humana aisladas recientemente.

La figura 3A es un diagrama de barras que muestra los resultados de un ensayo de rodamiento de transferencia de la actividad del ligando de la E-selectina.

La figura 3B es una fotografía de una transferencia Western que muestra el efecto del tratamiento con N-glucosidasa-F sobre la tinción con HECA-452.

La figura 3C es una fotografía de transferencia Western que muestra la expresión de PSGL-1 en células KG1a.

La figura 3D es una fotografía de una membrana de un ensayo de rodamiento de transferencia que muestra el efecto del tratamiento con N-glucosidasa-F sobre la actividad de ligando para E-selectina.

La figura 4A es una fotografía de una membrana de un ensayo de rodamiento de transferencia que muestra la actividad de unión a E-selectina de HCELL inmunoprecipitado exhaustivamente con el anticuerpo anti-CD44 (Hermes-1). (Pre-Ippt): lisado total de KG1a 10 μ g; (calle 1): primera ronda de inmunoprecipitación con Hermes-1; (calle 2) Segunda ronda de inmunoprecipitación con Hermes-1; (calle 3): tercera ronda de inmunoprecipitación con Hermes-1; (calle 4): lisado residual después de las 3 rondas de inmunoprecipitación con Hermes-1.

La figura 4B es una fotografía de una membrana de un ensayo de rodamiento de transferencia que muestra la actividad de unión a E-selectina del HCELL inmunoprecipitado exhaustivamente con el anticuerpo Hermes-1 y la transferencia teñida con el anticuerpo HECA-452. (Pre-Ippt): lisado total de KG1a 10 μ g; (calle 1): primera ronda de inmunoprecipitación con Hermes-1; (calle 2) Segunda ronda de inmunoprecipitación con Hermes-1; (calle 3): tercera ronda de inmunoprecipitación con Hermes-1; (calle 4): lisado residual después de las 3 rondas de inmunoprecipitación con Hermes-1.

La figura 5A es un gráfico de barras del rodamiento de células CHO-E mediado por E-selectina. El rodamiento se observó a 2, 8 dinas/cm² sobre CD44 KG1a, pero fue significativamente más bajo sobre KG1a PSGL-1 a 2, 8 dinas/cm² ($p < 0,001$). KG1a CD44 tratada con N-glucosidasa-F y L-fucosidasa y el tratamiento de la proteína de membrana de KG1a con neuraminidasa de *Vibrio cholerae* eliminaron el rodamiento de las células CHO-E ($p < 0,001$).

La figura 5B es un gráfico de barras que muestra rodamiento de células CHO-P. El rodamiento se observó sobre KG1a PSGL-1 pero no sobre KG1a CD44 (2, 8 dinas/cm²). No se observó rodamiento sobre los controles negativos (células CHO-Simuladas y células CHO-P pretratadas con función de bloqueo del anticuerpo monoclonal anti-P-selectina AK-4 (10 μ g/ml)).

La figura 6A es una fotografía de una membrana de un ensayo de rodamiento de transferencia que muestra actividad HCELL de varias células hematopoyéticas. (1) Células mononucleares de médula ósea humana (10^8 células), (2) células CD34-/linaje+ (10^7 células), (3) células CD34+/linaje- (10^7 células), (4) células CD34-/linaje+ (10^8 células).

La figura 6B es una fotografía de una transferencia Western que ilustra el efecto del tratamiento con N-glucosidasa-F sobre la actividad de HECA-452 en blastos circulantes de leucemia mieloide del adulto (LMA)

La figura 6C es una fotografía de una membrana que muestra los resultados del ensayo de rodamiento de transferencia de la proteína de membrana (M5) (50 µg) de LMA inmunoprecipitada con control de isotipo o con EL anticuerpo monoclonal Hermes-1 y de inmunoprecipitados de Hermes-1 tratados con N-glucosidasa-F.

Fig. 6D es una fotografía que muestra tinción con HECA-452 de CD44 inmunoprecipitado de preparaciones de membrana (50 µg) de una línea celular de LMA (M0), LMA (M1) y LMC atípica (bcr/abl) y endotelial de médula ósea humana (BMEC-1 100 µg de proteína total) que se evaluaron para determinar la actividad del ligando de la E-selectina. La actividad del ligando de la E-selectina se correlaciona con la intensidad de la tinción con HECA-452 de la banda de 100 kDa.

La figura 6E es una fotografía de una transferencia Western que muestra la expresión de CD44 de BMEC-1.

La figura 7A es una fotografía de una transferencia Western de proteínas de membrana reactivas a HECA-452 (30 µg/calle) de líneas celulares de leucemia humana K562 (calle 1), RPMI-8402 (calle 2), HL-60 (calle 3), KG1a (calle 4), KG1a tratada con neuraminidasa (calle 5) y KG1a tratada con OSGE (calle 6).

La figura 7B es una fotografía de transferencia Western que muestra la reexpresión de proteínas reactivas a HECA-452 sobre células enteras KG1a después del tratamiento con neuraminidasa y seguidamente con tunicamicina. Calles: 1, sin tratar; 2, neuraminidasa; 3, neuraminidasa y posteriormente recuperación durante 24 horas con DMSO; y 4, neuraminidasa, después recuperación durante 24 horas con tunicamicina.

La figura 7C es una fotografía de una autorradiografía de proteínas de membrana KG1a radiomarcadas metabólicamente con 2-[³H]-manosa resuelta en un SDS-PAGE el 6 % en condiciones reductoras.

La figura 7D es un gráfico de barras que muestra la adherencia y rodamiento) de los linfocitos dependiente de L-selectina sobre una membrana de transferencia en condiciones de flujo hidrodinámico (2, 3 dinas/cm²) sobre las proteínas KG1a portadoras de HECA-452 de 98, 120 y 130 kDa.

La figura 8 es una fotografía de transferencia Western que muestra la reactividad del fragmento de gel de 98 kDa proveniente de la tercera etapa del esquema de purificación de SDS-PAGE de 3 etapas (6 a 9 % de bis/acrilamida) con HECA-452 (0, 4 µg/ml) o con anticuerpos monoclonales anti-CD44 (A3D8 o Hermes-1 (1 µg/ml)).

La figura 9 es una fotografía de una membrana que muestra los resultados de un ensayo de rodamiento de transferencia mediado por L-selectina de KG1a CD44 inmunoprecipitado inmunoteñido con Hermes-1 (izquierda) o HECA-452 (derecha).

La figura 10A es una fotografía de una membrana que muestra los resultados de un ensayo de rodamiento de transferencia del tratamiento con N-glucosidasa-F sobre la actividad del ligando de L-selectina del CD44 inmunoprecipitado de células KG1a.

La figura 10B es una fotografía de una membrana que muestra los resultados de un ensayo de rodamiento de transferencia del tratamiento con N-glucosidasa-F sobre la actividad del ligando de L-selectina del CD44 inmunoprecipitado de blastos de LMA (M5).

La figura 11A es una fotografía de un autorradiograma de CD44 inmunoprecipitado de células KG1a no tratadas o tratadas con clorato radiomarcadas con [³⁵S]SO₄.

La figura 11B es una fotografía de inmunotransferencias con HECA-452 de KG1a CD44 inmunoprecipitado de células KG1a tratadas con clorato (+) y no tratadas con clorato (-). La actividad del ligando de L-selectina (número medio de linfocitos/campo de aumento 200X/5 campos) fue equivalente en KG1a CD44 sulfatada y no sulfatada (tratada con clorato).

La figura 12A es un gráfico de barras que muestra los resultados del rodamiento de linfocitos sobre líneas celulares hematopoyéticas fijadas con glutaraldehído KG1a, HL60, K562 y RPMI 8402, en un intervalo de tensión de corte.

La figura 12B es un gráfico de barras que muestra los resultados del rodamiento de neutrófilos sobre líneas celulares hematopoyéticas fijadas con glutaraldehído KG1a, HL60, K562 y RPMI 8402, en un intervalo de tensión de corte.

La figura 12C es un gráfico que muestra los resultados del ensayo de Stamper-Woodruff basado en cizalladura, que evalúa la capacidad de las líneas celulares KG1a, HL60, K562 y RPMI 8402 para mantener la unión de los linfocitos mediada por L-selectina en un intervalo de rpm. La adherencia media de los linfocitos a las células KG1a fue 10 veces mayor que a las células HL60 (prueba de t-Student pareada; p<0.001). Toda la adherencia de los linfocitos mediada por L-selectina se eliminó pretratando los linfocitos con anticuerpos monoclonales anti-L-selectina (10 µg/ml), utilizando linfocitos tratados con PMA, y o utilizando medio de ensayo que contiene EDTA 5 mM.

La figura 13A es un gráfico de barras que muestra el rodamiento de CHO-P-selectina o transfectantes falsos, sobre las monocapas de células hematopoyéticas fijadas con glutaraldehído medido en una cámara de flujo de placas paralelas. Las células KG1a y HL60 soportaron un rodamiento celular similar de CHO-P mediado por selectina-P a 0.4 dinas/cm².

La figura 13B es un gráfico que muestra interacciones de rodamiento de células CHO-P sobre células KG1a y HL60 que se midieron en un intervalo similar de tensión de corte y se eliminaron en presencia de EDTA y se evitaron pretratando las células KG1a y HL60 con mocoaragina (10 µg/ml).

La figura 14A es una fotografía de una autorradiografía de inmunoprecipitados Hermes-1 (CD44) y PL-2 (PSGL-1) y la actividad de ligando para L-selectina de HCELL y PSGL-1.

La figura 14B es un gráfico que muestra los resultados de ensayos de Stamper-Woodruff de KG1a CD44 inmunoprecipitado (1, 5 µg) y PSGL-1 (3 µg).

Las figuras 15 A-F son microfotografías de linfocitos unidos a HC CD44 o PSGL-1 humanas en el ensayo de Stamper-Woodruff. Se prepararon, CD44 de KG1a o de LMA (M1) (1,5 µg) y KG1a PSGL-1 (2 o 6 µg)

purificados por inmutafinidad según está descrito en los Métodos, y se analizó la adherencia de los linfocitos mediada por L-selectina mediante la prueba de Stamper-Woodruff. CD44 de KG1a o de LMA (M1) (paneles A y D, respectivamente) soportaron un número significativamente mayor de linfocitos que las respectivas CD44 tratadas con N-glucosidasa-F (paneles B y E) y los inmunoprecipitados con control DE isotipo, anticuerpo monoclonal (Hermes-1) solo o inmunoprecipitado con L-selectina (todos representados por los paneles C y F para KG1a y LMA (M1), respectivamente). Los anticuerpos anti-L-selectina (10 pg/ml), el medio de ensayo que contiene EDTA 5 mM o linfocitos tratados con PMA (50 ng/ml), inhibieron completamente la adherencia de los linfocitos (también indicado en paneles C y F de las células KG1a y de LMA (M1) respectivamente), lo que verifica la especificidad de la L-selectina de los linfocitos en este sistema de ensayo.

La figura 16 es una fotografía de una transferencia Western que muestra el o los epítomos de HECA-452 en KG1a CD44 y PSGL-1.

La figura 17A-B son fotografías que muestran la expresión de glucosiltransferasas (FucTIV, FucTVII y ST3GalIV) en líneas celulares hematopoyéticas humanas. Panel A) análisis de LA expresión por RT-PCR de FucTIV y FucTVII. Calle 1: FucTIV, Calle 2: FucTVII, Calle 3: f3-actina, y Calle 4: ddH₂O. (Panel B) análisis de expresión por RT-PCR de ST3GalIV. Calle 1: ST3GalIV, Calle 2: f3-actina, y Calle 3: ddH₂O.

Descripción detallada

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de un nuevo polipéptido glucosilado expresado en células progenitoras hematopoyéticas humanas normales y en blastos leucémicos llamado ligando de selectina E/selectina L de las células hematopoyéticas (HCELL). Los polipéptidos de HCELL también se denominan en el presente documento "KG1a CD44". Usando el ensayo de rodamiento de transferencia se demostró que HCELL es una nueva forma glucosilada de CD44 que contiene N-glicanos sialilados y fucosilados que reaccionan con HECA-452. El polipéptido HCELL es un ligando tanto de la selectina-L como de la selectina-E. La actividad del ligando de L-selectina y E-selectina de HCELL requiere glicanos sialofucosilados unidos a N que son reconocidos por el anticuerpo monoclonal de rata HECA-452 y esta unión es independiente de sulfatación.

CD44 es un receptor glucoproteína de la superficie celular del glucosamino glicano hialuronano (HA), que es un componente muy importante del espacio extracelular. Está expresado en una variedad muy diversa de tipos celulares, incluyendo la mayoría de las células hematopoyéticas, queratinocitos, condrocitos, muchos tipos de células epiteliales, y algunas células endoteliales y neurales. Se sabe que el CD44 participa en una amplia variedad de funciones celulares, incluyendo la agregación célula-célula, la retención de matriz pericelular, la señalización matriz-célula y célula-matriz, la internalización/degradación de hialuronano mediada por receptor, y la migración celular. Todas estas funciones dependen de interacciones hialuronano-CD44 y es dependiente de la sulfatación.

El gen que codifica CD44 está compuesto de 20 exones (19 exones según la literatura anterior, los exones 6a y 6b se han reclasificado a exones 6 y 7, que hacen los 20 exones en total). Aunque un único gen localizado en el brazo corto del cromosoma 11 humano codifica CD44, se han identificado múltiples transcritos de ARNm que surgen del corte y empalme alternativo de 12 de los 20 exones. La forma estándar y más prevalente de CD44 (denominado CD44) consiste en una proteína codificada por los exones 1-5, 16-18, y 20. Esta forma es la forma más predominante en las células hematopoyéticas, y es conocida también como CD44H. CD44 presenta los dominios extracelulares (exones 1-5 y 16). El dominio transmembrana altamente conservado (exón 18) y el dominio citoplásmico (exón 20). Los 1482 pb del marco de lectura abierto del ARNm del CD44 humano da como resultado la traducción de una cadena polipeptídica de □ 37 kDa. La adición postraducción de oligosacáridos unidos a N o a O contribuye a la masa molecular de □ 85 kDa de la proteína CD44 final como se estima por SDS-PAGE.

La isoforma estándar o hematopoyética de CD44 (CD44H) es una molécula transmembrana de tipo 1 compuesta por □ 270 aminoácidos (aa) de dominio extracelular (incluyendo 20 aa de la secuencia líder, un dominio transmembrana de 21 aa y un dominio intracitoplásmico de 72 aa). Los ~ 180 aa en el extremo amino están conservados entre las especies de mamíferos (homología ~ 85 %). Esta región contiene 6 cisteínas conservadas y 6 regiones consenso conservadas para N glucosilación. Cinco regiones consenso conservadas para N-glucosilación se localizan en los 120 aa aminoterminales de CD44. Los 5 sitios parecen utilizarse en las líneas celulares humanas y murinas. En varios estudios se ha mostrado que la N-glucosilación específica de la célula puede modular la función de unión al HA de CD44. Las líneas celulares y las células-B normales mostraron diferencias en la N-glucosilación asociada a diferentes estados de unión a HA. En particular, el CD44 de las células que se unen a HA tenía menos glucosilación que el de las células que no se unen a HA. Adicionalmente, la retirada de ácidos siálicos (tanto de la superficie celular como de las proteínas de fusión CD44-Ig) aumenta la unión a HA. Así la glucoforma de CD44 HCELL de la invención es diferente a cualquier CD44 descrito previamente.

En contraste, la región no conservada (aa ~ 183 a 256) muestra solo ~ 35 % de similitud entre las especies de mamíferos. Esta región contiene posiciones potenciales para numerosas modificaciones de CD44 con carbohidratos y el sitio de corte y empalme alternativo que permite la inserción de la secuencia de aminoácidos extra de los exones variables del gen de CD44.

Un polipéptido HCELL comprende una secuencia de aminoácidos de CD44 y se une a un anticuerpo que tiene la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal HECA-452 (Número ATCC: HB-11485) HECA-452 reconoce el

antígeno asociado al linfocito cutáneo. La unión de HCELL a HECA-452 disminuye después del tratamiento con N-glucosidasa-F, sialidasa o fucosidasa. Además, la actividad de HCELL, por ejemplo, unión a E-selectina y a L-selectina, también disminuye con el tratamiento con N-glucosidasa-F, sialidasa o fucosidasa, lo que demuestra la importancia de los glicanos unidos a N sialofucosilados en la función de HCELL. En contraste, la sialilación de CD44

5 inhibe la unión de CD44 al ácido hialurónico. Además la unión de CD44 al hialuronato aumenta mediante la sulfatación, pero la sulfatación no es necesaria para la actividad E-selectina y L-selectina de HCELL.

Preferentemente, el polipéptido CD44 es la isoforma estándar o hematopoyética de CD44 (CD44H). Como alternativa, el polipéptido CD44 es la isoforma R1 (CD44R1) o R2 (CD44R2). Por ejemplo, un polipéptido HCELL

10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
(Gen Bank, con número de registro CAA40133; Tabla 1) Un polipéptido HCELL es al menos aproximadamente 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, o 95 % idéntico a la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 1.

Tabla 1

1 mdkfwwhaaw glclvplsla qidlnitcrf agvfhvckng rysisrteaa dlckafnstl
61 ptmaqmekal sigfetcryg fieghvvipr ihpnsciaan ntgvyltsn tsqydytcfn
121 asappeedct svtdlpnafg gpititivr dgtryvqkge yrtnpediyp snptddvss
181 gsserssts ggyifytst vhpipedsp wtdstddp atnmdsshst tlqptanpnt
241 glvedldrtg plsmttqqsn sqsfstsheg leedkdhppt stltssnrm vtggrdrpnh
301 segsttlleg ytshyphtke srtfipvtsa ktgsfgvtav tvgdsnsnv rslsgdqdf
361 hpssgshth gsesdghshg sqeggannts gpirtqipe wliilasla lalilavcia
421 vnsrrcgqk kklvinsngn avedrkspl ngeasksqem vhlvnkesse tpdqfntade
481 trnlqnvdmk igv (SEQ ID NO:1)

Polipéptidos de HCELL

Los inventores describen glucoproteínas de HCELL aisladas y porciones biológicamente activas de las mismas, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de las mismas. También se describen fragmentos de polipéptidos apropiados para su uso como inmunógenos para generar anticuerpos anti-HCELL. En una realización, las glucoproteínas de HCELL nativas se pueden aislar de células o tejidos mediante un esquema de purificación adecuado usando técnicas estándar de purificación de proteínas.

En otra realización, las glucoproteínas de HCELL se producen por técnicas de ADN recombinante. De forma alternativa a la expresión recombinante, una glucoproteína o polipéptido de HCELL se pueden sintetizar químicamente usando técnicas de síntesis peptídica estándar.

Una proteína "aislada" o "purificada" o una porción biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular de la que la glucoproteína HCELL deriva o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de glucoproteína HCELL en las que la proteína está separada de los componentes celulares de las células de las que se aísla o produce de forma recombinante. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de glucoproteína HCELL que tienen menos de aproximadamente 30 % (en peso seco) de glucoproteína no HCELL (también denominada en el presente documento como una "proteína contaminante"), más preferiblemente menos de aproximadamente 20 % de glucoproteína no HCELL, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 10 % de glucoproteína no HCELL, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 5 % de glucoproteína no HCELL. Cuando la glucoproteína HCELL o la o una porción biológicamente activa de la misma se producen de forma recombinante, están, preferentemente, sustancialmente libres de medio de cultivo, es decir el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20 %, más preferiblemente menos de aproximadamente 10 %, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 5 % del volumen de la preparación de proteína.

La expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas" incluye preparaciones de glucoproteína HCELL en las que la proteína es separada de precursores químicos u otras sustancias químicas que están implicados en la síntesis de la proteína. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas" incluye preparaciones de glucoproteína HCELL que tienen menos de aproximadamente 30 % (en peso seco) de precursores químicos o sustancias químicas no HCELL, más preferiblemente menos de aproximadamente 20 % de precursores químicos o sustancias químicas no HCELL, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 10 % de precursores químicos o sustancias químicas no HCELL, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 5 % de precursores químicos o sustancias químicas no HCELL.

Las porciones biológicamente activas de una glucoproteína HCELL incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente homólogas a, o derivadas de, la secuencia de aminoácidos de la glucoproteína HCELL, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, que incluye menos aminoácidos de las glucoproteínas HCELL de longitud completa, y exhiben al menos una actividad de una glucoproteína HCELL, por ejemplo reactividad frente al anticuerpo HECA-452, reactividad frente al anticuerpo anti-CD44, unión a E-

selectina o unión a L-selectina. Normalmente, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de glucoproteína HCELL, por ejemplo sitios para la glucosilación unidos a N. Una porción biológicamente activa de una glucoproteína HCELL puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, una longitud de 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos. Preferiblemente, la porción biológicamente activa de una glucoproteína HCELL incluye la secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de un polipéptido CD44.

Estas realizaciones pueden contener al menos uno de los dominios estructurales identificados anteriormente. Además, otras porciones biológicamente activas en las que otras regiones de la proteína marcadora están delecionadas se pueden preparar mediante técnicas recombinantes y evaluar para determinar una o más de las actividades funcionales de una glucoproteína HCELL nativa, por ejemplo, actividad de unión a E-selectina, L-selectina. En una realización, la glucoproteína HCELL tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, la glucoproteína HCELL es sustancialmente homóloga a la SEQ ID NO: 1 y retiene la actividad funcional de la proteína de SEQ ID NO: 1 y aún difiere en la secuencia de aminoácidos debido a la variación alélica natural o mutagénesis, como se describe con detalle a continuación. Por consiguiente, en otra realización, la glucoproteína HCELL es una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 45 % homóloga a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y retiene la actividad funcional de las glucoproteínas HCELL SEQ ID NO: 1.

Como alternativa, un polipéptido HCELL tiene una secuencia de aminoácidos de CD44 capaz de glucosilación ligada a N.

Proteínas quiméricas y de fusión

Los inventores también describen proteínas de fusión o quiméricas HCELL. Como se usa en el presente documento, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" HCELL comprende un polipéptido HCELL unido operativamente a un polipéptido no HCELL. Un "polipéptido HCELL" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a HCELL, mientras que un "polipéptido no HCELL" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a una proteína que no es sustancialmente homóloga a la glucoproteína HCELL, por ejemplo, una proteína que es diferente a la glucoproteína HCELL y que deriva del mismo organismo o de uno diferente. En una proteína de fusión HCELL, el polipéptido HCELL puede corresponder a todo o a una porción de una glucoproteína HCELL. En una realización, una proteína de fusión HCELL comprende al menos una porción biológicamente activa de una glucoproteína HCELL. En otra realización, una proteína de fusión HCELL comprende al menos dos porciones biológicamente activas de una glucoproteína HCELL. En otra realización más, una proteína de fusión HCELL comprende al menos tres porciones biológicamente activas de una glucoproteína HCELL. En la proteína de fusión, el término "unido operativamente" pretende indicar que el polipéptido HCELL y el polipéptido no HCELL están fusionados el uno al otro dentro del marco. El polipéptido no HCELL puede fusionarse al extremo N-terminal o C-terminal del polipéptido HCELL. Por ejemplo, en una realización, una proteína de fusión HCELL comprende un dominio de unión a anti-CD44 de HCELL unido operativamente al dominio extracelular de una segunda proteína. Tales proteínas de fusión se pueden utilizar posteriormente en ensayos de detección selectiva para compuestos que modulan la actividad de HCELL.

En una realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión GST-HCELL en la que las secuencias de HCELL están fusionadas al extremo C-terminal de las secuencias de GST (por ejemplo, glutatión S-transferasa). Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de HCELL recombinante. En otro ejemplo, la proteína de fusión es una glucoproteína de HCELL que contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N-terminal. Por ejemplo, la secuencia señal de HCELL nativa puede retirarse y sustituirse por una secuencia señal de otra proteína. En ciertas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamífero), la expresión y/o la secreción de HCELL puede aumentarse a través del uso de una secuencia señal heteróloga.

La presente invención se refiere a una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende un polipéptido glicosilado, comprendiendo dicho polipéptido glicosilado una cadena principal del polipéptido CD44 que muestra glicanos sialilados, fucosilados y se une a la E-selectina y a la L-selectina.

En una realización, el polipéptido glicosilado o la estructura principal del polipéptido CD44 glicosilado de una proteína de fusión de inmunoglobulina de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o comprende la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % similar a la SEQ ID NO: 1.

En otra realización, el polipéptido glicosilado o polipéptido CD44 glicosilado de una proteína de fusión de inmunoglobulina de la invención muestra glicanos fucosilados sialilados reactivos a HECA-452.

Como se ha divulgado anteriormente, en una realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión HCELL-inmunoglobulina en la que la secuencia de HCELL o fragmentos de la misma se fusionan a secuencias derivadas de un miembro de la familia de proteínas de las inmunoglobulinas. Las proteínas de fusión de HCELL-inmunoglobulina del invento pueden ser incorporarse en composiciones farmacéuticas y administrarse a un sujeto para inhibir la interacción en la superficie de la célula entre un ligando para HCELL y una glucoproteína HCELL, y así suprimir *in vivo* la transducción de la señal mediada por HCELL. Las proteínas de fusión HCELL-inmunoglobulina pueden usarse para afectar a la biodisponibilidad de un ligando afín para HCELL. La inhibición de la interacción

HCELL/ligando para HCELL puede ser útil en el tratamiento de trastornos proliferativos y diferenciativos, así como modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la supervivencia celular.

Además, las proteínas de fusión HCELL-inmunoglobulina de la invención se pueden usar como inmunógenos para producir anticuerpos anti-HCELL en un sujeto, para purificar ligandos de HCELL, y en ensayos de detección selectiva para identificar moléculas que inhiban la interacción de HCELL con un ligando de HCELL.

Una proteína de fusión o quimérica de HCELL puede producirse mediante técnicas de ADN recombinante estándar. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias polipeptídicas se unen dentro del marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo usando extremos romos o escalonados para la ligadura, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos adecuados, llenado con extremos cohesivos según sea adecuado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones no deseadas y ligadura enzimática. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales, incluidos sintetizadores de ADN automáticos. Como alternativa, se puede llevar a cabo la amplificación de fragmentos génicos usando cebadores de ancla que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que después se pueden hibridar y reamplificar para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Ausubel et al. (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Además, muchos vectores de expresión que ya codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST) están disponibles comercialmente. Un ácido nucleico que codifica HCELL puede clonarse en dicho vector de expresión de forma que el resto de fusión se una dentro del marco a la glucoproteína HCELL.

Agonistas y antagonistas de HCELL

Los inventores describen variantes de las glucoproteínas HCELL que funcionan como agonistas (miméticos) de HCELL o como antagonistas de HCELL. Se pueden generar variantes de la glucoproteína HCELL mediante mutagénesis, por ejemplo mutación puntual pequeña o truncamiento de la glucoproteína HCELL. Un agonista de la glucoproteína HCELL puede mantener sustancialmente las mismas, o una parte de, las actividades biológicas de la forma natural de la glucoproteína HCELL. Un antagonista de la glucoproteína HCELL puede inhibir una o más de las actividades de la forma natural de la glucoproteína HCELL mediante, por ejemplo, la unión competitiva un miembro corriente abajo o corriente arriba de una cascada de señalización celular que incluye la glucoproteína HCELL. Por tanto, se pueden provocar efectos biológicos específicos mediante tratamiento con una variante de función limitada. En una realización, el tratamiento de un sujeto con una variante que posee un subconjunto de las actividades biológicas de la forma natural de la proteína tiene menos efectos secundarios en un sujeto con respecto al tratamiento con la forma natural de la glucoproteína HCELL.

Las variantes de la glucoproteína HCELL que funcionan bien como agonistas (miméticos) de HCELL o como antagonistas de HCELL se pueden identificar mediante detección selectiva de bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo, mutantes por truncamiento, la glucoproteína HCELL para la actividad agonista o antagonista de la glucoproteína HCELL. En una realización, una biblioteca abundante de variantes de HCELL se genera mediante mutagénesis combinatoria a nivel del ácido nucleico y se codifica mediante una biblioteca génica abundante. Una biblioteca abundante de variantes de HCELL se puede producir mediante, por ejemplo, unión enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de modo que el conjunto degenerado de posibles secuencias de HCELL se pueda expresar como polipéptidos individuales o, como alternativa, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para expresión en fagos) que contienen el conjunto de secuencias de HCELL en las mismas. Hay diversos métodos que se pueden usar para producir bibliotecas de variantes potenciales de HCELL a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerados. La síntesis química de una secuencia génica degenerada se puede llevar a cabo en un sintetizador de ADN automático y los genes sintéticos se ligan después en un vector de expresión adecuado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite proporcionar, en una mezcla, todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de potenciales secuencias de HCELL. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Narang (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu Rev Biochem 53:323; Itakura et al. (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucl Acid Res 11:477.

Anticuerpos anti-HCELL

Los inventores también describen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, tales como Fab o (Fab)₂, que se unen de forma inmuno-específica a cualquiera de los polipéptidos de la invención. Una glucoproteína HCELL aislada, o una porción o fragmento de la misma, puede usarse como inmunógeno para generar anticuerpos que se unan a HCELL utilizando técnicas estándar para la preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales. Se puede utilizar la glucoproteína HCELL de longitud completa o, como alternativa, la invención proporciona fragmentos peptídicos antigénicos de HCELL para su uso como inmunógenos. El péptido antigénico de HCELL comprende al menos 4 restos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y engloba un epítipo de HCELL tal que un anticuerpo generado contra el péptido forma un inmunocomplejo específico con HCELL. Preferiblemente, el péptido antigénico comprende al menos 6, 8, 10, 15, 20 o 30 restos de aminoácido. En ocasiones son preferibles los péptidos antigénicos más largos a los péptidos antigénicos más cortos, dependiendo del uso y de acuerdo con métodos bien conocidos para un experto en la técnica. Más preferentemente, el péptido antigénico

debe comprender al menos un sitio de glucosilación unido a N.

En ciertas realizaciones, al menos un epítipo englobado por el péptido antigénico esté en una región de HCELL que se localiza en la superficie de la proteína, por ejemplo, como una región hidrofílica. Como medios para dirigir la producción de anticuerpo, se pueden generar gráficos de hidropatía que muestran regiones de hidrofilia e hidrofobia, mediante cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo, los métodos Kyte Doolittle o Hopp Woods, con o sin transformación de Fourier. Véase, por ejemplo, Hopp y Woods, 1981, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 3824–3828; Kyte y Doolittle 1982, 157: 105–142.

Como se describe en el presente documento, la secuencia de la glucoproteína HCELL, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de la misma pueden usarse como inmunógenos en la generación de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a estos componentes proteicos. El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento hace referencia a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a (inmunorreacciona con) un antígeno, tal como HCELL. Dichos anticuerpos incluyen, entre otros, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, fragmentos Fab y F(ab')₂ una biblioteca de expresión de Fab. En una realización específica, se desvelan anticuerpos frente a la glucoproteína HCELL humana. Se pueden usar varios procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales frente a una secuencia de la glucoproteína HCELL de SEQ ID NO: 1, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de la misma. Algunas de estas proteínas se tratan a continuación.

Para la producción de anticuerpos policlonales, varios animales huésped adecuados (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) se pueden inmunizar con una inyección de la proteína nativa, o una variante sintética de la misma, o un derivado de la anterior. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, glucoproteína HCELL expresada recombinantemente o un polipéptido de HCELL sintetizado químicamente. La preparación puede incluir además un adyuvante. Varios adyuvantes usados para aumentar la respuesta inmunológica incluyen, pero sin limitaciones, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio), sustancias de superficie activa (por ejemplo, lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, etc.), adyuvantes humanos, tales como el bacilo de *Calmette-Guerin* y *Corynebacterium parvum*, o agentes inmunoestimulantes similares. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra HCELL se pueden aislar del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificar adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía en proteína A para obtener el anticuerpo, por ejemplo la fracción de IgG.

La expresión "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie de un sitio de unión a antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo concreto de HCELL. Por tanto, una composición de anticuerpo monoclonal normalmente muestra una especificidad y afinidad de unión sencilla por una glucoproteína HCELL concreta con la que inmunorreacciona. Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra una glucoproteína HCELL particular, o derivados, fragmentos, análogos, u homólogos de la misma, se puede usar cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante cultivo continuo de líneas celulares. Tales técnicas incluyen, pero no se restringen a, la técnica del hibridoma (véase Kohler & Milstein, 1975 Nature 256: 495–497); la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de células B humanas (véase Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4: 72) y la técnica del hibridoma de VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77–96). Se pueden utilizar anticuerpos monoclonales humanos y se pueden producir usando hibridomas humanos (véase Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026–2030) transformando *in vitro* células B humanas con el virus de Epstein Barr (véase Cole, et al., 1985 En: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77–96).

Las técnicas descritas anteriormente se pueden adaptar para la producción de anticuerpos de cadena simple específicos frente a una glucoproteína HCELL (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.946.778). Además, se pueden adaptar metodologías para la construcción de bibliotecas de expresión de F_{ab} (véase, por ejemplo, Huse, et al., 1989 Science 246: 1275–1281) para permitir la identificación rápida y efectiva de fragmentos F_{ab} monoclonales con la especificidad deseada frente a una glucoproteína HCELL o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de la misma. Los anticuerpos no humanos pueden "humanizarse" mediante técnicas bien conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.225.539. Los fragmentos de anticuerpo que contienen idiotipos frente a una glucoproteína HCELL se pueden producir mediante técnicas bien conocidas en la materia, incluyendo, pero sin limitaciones: (i) un fragmento F(ab')₂ producido mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento Fab generado mediante la reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂; (iii) un fragmento Fab' generado tratando la molécula de anticuerpo con papaina y un agente reductor, y (iv) fragmentos F_v.

Adicionalmente también se pueden usar los anticuerpos anti-HCELL recombinantes, tales como los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones humanas y no humanas, que se pueden preparar usando técnicas de ADN recombinantes estándar. Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y

humanizados se pueden producir usando técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia, por ejemplo usando métodos descritos en la solicitud internacional n.º PCT/US86/02269; la solicitud de patente europea n.º 184.187; la solicitud de patente europea n.º 171.496; la solicitud de patente europea n.º 173.494; la publicación internacional de PCT n.º WO 86/01533; la patente de Estados Unidos n.º 4.816,567; la patente de Estados Unidos n.º 5.225,539; la solicitud de patente europea n.º 125.023; Better et al. (1988) Science 240:1041-1043; Liu y col. (1987) PNAS 84:3439-3443; Liu et al. (1987) J Immunol. 139:3521-3526; Sun et al. (1987) PNAS 84:214-218; Nishimura et al. (1987) Cancer Res 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-449; Shaw et al. (1988) J Natl Cancer Inst 80:1553-1559; Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214; Jones et al. (1986) Nature 321:552-525; Verhoeyan y col. (1988) Science 239:1534; y Beidler y col. (1988) J Immunol 141:4053-4060.

En una realización, las metodologías para la detección selectiva de anticuerpos que poseen la especificidad deseada incluyen, pero sin limitaciones, ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA) y otras técnicas mediadas inmunológicamente conocidas en la materia. En una realización específica se facilita la selección de anticuerpos que son específicos de un dominio particular de una glucoproteína HCELL mediante la generación de hibridomas que se unen al fragmento de la glucoproteína HCELL que posee tal dominio. En el presente documento también se proveen anticuerpos que son específicos de un sitio de glucosilación unido a N, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos del mismo.

Se pueden utilizar anticuerpos anti-HCELL en métodos conocidos en la materia relacionados con la localización y/o cuantificación de una glucoproteína HCELL (por ejemplo, para el uso de cuantificación de niveles de glucoproteína HCELL en muestras fisiológicas apropiadas, para el uso en métodos diagnósticos, para el uso en obtención de imágenes de la proteína, y similares). En una realización dada, los anticuerpos frente a glucoproteínas HCELL, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de las mismas, que contienen el dominio de unión derivado del anticuerpo, se usan como compuestos farmacológicamente activos (véase a continuación "Therapeutics").

Un anticuerpo anti-HCELL (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) se puede usar para aislar HCELL mediante técnicas estándar, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Un anticuerpo anti-HCELL puede facilitar la purificación de HCELL natural a partir de células y de HCELL producido de forma recombinante expresado en células huésped. Además, un anticuerpo anti-HCELL puede usarse para detectar glucoproteína HCELL (por ejemplo, en un lisado celular o sobrenadante de células) con objeto de evaluar la abundancia y el patrón de expresión de la glucoproteína HCELL. Se pueden utilizar anticuerpos anti-HCELL desde el punto de vista diagnóstico para monitorizar niveles de proteína en tejido como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. Como alternativa se usan anticuerpos anti-HCELL para tratar o diagnosticar leucemia. La detección se puede facilitar mediante acoplamiento (por ejemplo, unión física) del anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo, puntos cuánticos o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y acurina, y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

Vectores de expresión recombinantes de HCELL y células huésped

Los inventores también describen vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica polipéptidos de HCELL, polipéptidos de fusión, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Otro tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN circular bicatenario en el que se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar en el genoma viral segmentos adicionales de ADN. Ciertos vectores son capaces de una replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (p. ej., vectores no episomales de mamífero) se integran en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped y, de este modo, se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante suelen estar en forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden usarse de forma intercambiable, ya que el plásmido es la forma de vector usada con más frecuencia. No obstante, la presente descripción está destinada a incluir esas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (p. ej., retrovirus defectuosos en la replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinante de la invención comprenden un ácido nucleico en una forma apropiada

para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo que significa que los vectores de expresión recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras seleccionadas basadas en las células huésped que vayan a usar para la expresión, que está operativamente unida a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. En un vector de expresión recombinante, “operablemente unido”, se usa en el presente documento, se pretende que signifique que la secuencia de nucleótidos de interés está relacionada con la(s) secuencia(s) reguladora(s) de un modo que permita la expresión de la secuencia de nucleótidos (p. ej., en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped).

Con la expresión “secuencia reguladora” se pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen en, por ejemplo, Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Las secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de célula huésped y las que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en ciertas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión pueda depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Los vectores de expresión de la invención se pueden introducir en las células huésped para producir de este modo proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como se describe en el presente documento.

Los vectores de expresión recombinante se pueden diseñar para la expresión de polipéptidos de HCELL o polipéptidos de fusión en células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, los polipéptidos de HCELL o polipéptidos de fusión pueden expresarse en células bacterianas tales como *Escherichia coli*, células de insectos (usando vectores de expresión baculovirus), células de levadura o células de mamíferos. Las células huésped adecuadas se discuten con más detalle en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Como alternativa, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo usando secuencias reguladoras promotoras de T7 y la polimerasa de T7.

La expresión de proteínas en procariotas se lleva a cabo normalmente en *Escherichia coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o de no fusión. Los vectores de fusión añaden una serie de aminoácidos a una proteína codificada en los mismos, usualmente al extremo amino terminal de la proteína recombinante. Estos vectores de fusión tienen normalmente tres objetivos: (i) aumentar la expresión de la proteína recombinante; (ii) aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y (iii) ayudar a la purificación de la proteína recombinante actuando como ligando en la purificación por afinidad. Frecuentemente, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un punto de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión después de la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento afines incluyen factor Xa, trombina y enterocinasa. Los vectores de expresión de fusión incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, 1988. *Gene* 67: 31–40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) que fusionan la glutatión S-transferasa (GST), la proteína de unión a maltosa E, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante diana.

Los ejemplos de vectores de expresión de no fusión de *E. coli* inducibles apropiados incluyen pTrc (Amrann et al., (1988) *Gene* 69:301–315) y pET 11d (Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60–89).

Una estrategia para maximizar la expresión de proteína recombinante en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria huésped con una capacidad alterada para escindir proteolíticamente la proteína recombinante. Véase, por ejemplo, Gottesman, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119–128. Otra estrategia es alterar la secuencia de ácidos nucleicos del ácido nucleico que se va a insertar en el vector de expresión de manera que los codones individuales para cada aminoácido sean aquellos utilizados preferentemente en *E. coli* (véase, por ejemplo Wada, et al., 1992. *Nucl. Acids Res.* 20: 2111–2118). Tales alteraciones de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención se pueden llevar a cabo mediante técnicas estándar de síntesis de ADN.

En otra realización, los vectores de expresión de polipéptidos o polipéptidos de fusión de HCELL pueden ser un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores de expresión en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari, et al., 1987. *EMBO J.* 6: 229–234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, 1982. *Cell* 30: 933–943), pJRY88 (Schultz et al., 1987. *Gene* 54: 113–123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) y picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.).

Como alternativa, los polipéptidos de HCELL o polipéptidos de fusión se pueden expresar en células de insecto usando vectores de expresión baculovirus. Los vectores baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto en cultivo (por ejemplo, células SF9) incluyen la serie pAc (Smith, et al., 1983. *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156–2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers, 1989. *Virology* 170: 31–39).

En otra realización más, un ácido nucleico de la invención se expresa en células de mamífero usando un vector de

expresión de mamífero. Ejemplos de vectores de expresión de mamíferos incluyen pCDM8 (Seed, 1987. Nature 329: 840) y pMT2PC (Kaufman, et al., 1987. EMBO J. 6: 187–195). Cuando se usan en células de mamíferos, las funciones de control de los vectores de expresión a menudo son proporcionadas por los elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores que se usan habitualmente derivan de poliovirus, adenovirus 2, citomegalovirus y virus del simio 40. Para otros sistemas de expresión apropiados tanto para células procariotas como eucariotas véase, por ejemplo, los capítulos 16 y 17 de Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

En otra realización, el vector de expresión recombinante de mamífero es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo de célula en particular (por ejemplo, se usan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejido se conocen en la técnica. Ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido apropiados incluyen el promotor de la albúmina (específico del hígado; Pinkert, et al., 1987. Genes Dev. 1: 268–277), promotores linfoides específicos (Calame y Eaton, 1988. Adv. Immunol. 43: 235–275), en promotores concretos de receptores de célula T (Winoto y Baltimore, 1989. EMBO J. 8: 729–733) e inmunoglobulinas (Banerji, et al., 1983. Cell 33: 729–740; Queen y Baltimore, 1983. Cell 33: 741–748), promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de los neurofilamentos; Byrne y Ruddle, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473–5477), promotores específicos del páncreas (Edlund, et al., 1985. Science 230: 912–916), y promotores específicos de glándula mamaria (por ejemplo, el promotor de suero de leche; patente de Estados Unidos n.º 4.873,316 y publicación de la solicitud europea n.º 264.166). También se abarcan promotores regulados en el desarrollo, por ejemplo, los promotores murinos *hox* (Kessel y Gruss, 1990. Science 249: 374–379) y el promotor de α -fetoproteína (Campes y Tilghman, 1989. Genes Dev. 3: 537–546).

Los inventores también describen un vector de expresión recombinante que comprenda una molécula de ADN de la invención clonada en un vector de expresión con una orientación antisentido. Es decir, la molécula de DNA está unida operativamente a una secuencia reguladora de un modo que permite la expresión (por transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido respecto a los polipéptidos de HCELL o al ARNm de los polipéptidos de fusión. Se pueden elegir secuencias reguladoras unidas operativamente a ácidos nucleicos clonados en orientación antisentido que dirijan la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en diversos tipos celulares, por ejemplo se pueden elegir promotores virales y/o potenciadores que dirijan la expresión constitutiva, específica de tejido o específica de tipo celular de ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en el que los ácidos nucleicos antisentido se producen bajo el control de una región reguladora de alta eficacia, cuya la actividad puede estar determinada por el tipo celular en el que el vector se introduce. Para discusión sobre la regulación de la expresión génica utilizando genes antisentido véase, por ejemplo, Weintraub, et al., "Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis," Reviews—Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986.

Otro aspecto se refiere a las células huésped en las que se ha introducido un vector de expresión. Los términos "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se usan en el presente documento indistintamente. Debe entenderse que dichos términos no sólo se refieren a la célula sujeto concreta, sino también a la progenie, o potencial progenie, de dicha célula. Dado que se pueden producir ciertas modificaciones en las generaciones posteriores debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía está incluida en el alcance del término tal como se usa en la presente memoria descriptiva.

Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, los polipéptidos de HCELL o polipéptidos de fusión se pueden expresar en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto, células de levaduras o células de mamífero (tales como células humanas, de ovario de hámster chino (CHO) o células COS). Otras células huésped adecuadas son bien conocidas para los expertos en la técnica.

El ADN del vector se puede introducir en células procariotas o eucariotas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se usan en el presente documento, se entiende que los términos "transformación" y "transfección" hacen referencia a diversas técnicas reconocidas en la materia para introducir ácidos nucleicos extraños (por ejemplo, ADN) dentro de una célula huésped, incluyendo coprecipitación con fosfato cálcico o cloruro cálcico, transfección mediada por dextrano DEAE, lipofección o electroporación. Se pueden encontrar métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), y otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección utilizada, solo una pequeña fracción de células pueden integrar el ADN extraño dentro de su genoma. Para identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica un marcador exclusivo (por ejemplo, la resistencia a antibióticos) se introduce generalmente dentro de las células huésped junto al gen de interés. Varios marcadores exclusivos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tal como G418, higromicina y metotrexato. Se puede introducir el ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable dentro de una célula huésped en el mismo vector que codifica los polipéptidos HCELL o polipéptidos de fusión o puede introducirse en un vector separado. Se pueden identificar mediante selección farmacológica células transfectadas de forma estable con

el ácido nucleico introducido (por ejemplo, la células que han incorporado el gen marcador selectivo sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

Una célula huésped como una célula procariota o eucariota en cultivo, puede utilizarse para producir (por ejemplo, expresar) polipéptidos HCELL o polipéptidos de fusión. En consecuencia, los inventores también describen métodos para producir polipéptidos de HCELL o polipéptidos de fusión usando células huésped. En una realización, el método comprende cultivar la célula huésped (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica polipéptidos de HCELL o polipéptidos de fusión) en un medio apropiado de manera que se producen polipéptidos de HCELL o polipéptidos de fusión. En otro ejemplo, el método comprende adicionalmente aislar polipéptidos de HCELL o polipéptidos de fusión del medio o de la célula huésped.

Método de identificación de células madre

Los inventores describen en el presente documento varios métodos para identificar y/o aislar células madre. Una célula madre es una célula pluripotencial de origen mesodérmico, ectodérmico o endodérmico. Preferentemente, una célula madre es de origen mesodérmico. Más preferentemente, una célula madre es una célula progenitora hematopoyética.

Una célula madre se identifica poniendo en contacto una población celular que se va a analizar con uno o más agentes, por ejemplo, una proteína, un polipéptido o una molécula pequeña, que se una específicamente a HCELL. Preferentemente, un agente es un anticuerpo o un fragmento del mismo. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Por ejemplo, un agente es un anticuerpo frente a HCELL. Como alternativa, un agente es un anticuerpo anti-CD44, o un anticuerpo HECA-452.

Con unión específica se quiere decir que la interacción entre la célula y el agente es suficiente para formar un complejo. Se detecta un complejo célula/agente. Presencia del complejo indica que la célula de ensayo es una célula madre. En un método alternativo, la célula madre se aísla de la población celular que se va a analizar retirando el complejo de la población celular de ensayo. El complejo se puede separar de la población celular de ensayo mediante métodos conocidos en la materia, por ejemplo, citometría de flujo. Adicionalmente, la célula madre puede aislarse posteriormente separando la célula madre del o los agentes destruyendo el complejo. El complejo puede ser destruido, por ejemplo, mediante quelación de iones con EDTA diluido.

Como alternativa, una célula madre se puede identificar proporcionando un polipéptido de selectina, por ejemplo, E-selectina o L-selectina, inmovilizado en una fase sólida, por ejemplo vidrio, plástico o membrana, y poniendo en contacto la fase sólida con una muestra de fluido que contiene una suspensión de células de ensayo. En algunos aspectos, la muestra de fluido se mueve. Por muestra de fluido en movimiento se quiere decir que la muestra fluye a través de la superficie de la membrana de un modo unidireccional. Las interacciones entre la muestra de fluido en flujo y el ligando inmovilizado se pueden examinar bajo una amplia gama de condiciones de flujo definidas, que van desde incubación estática hasta niveles fisiológicos de flujo de cizalladura, condiciones estáticas y aplicación seriada de condiciones estáticas o de cizalladura, y a niveles suprafisiológicos de cizalladura. Por ejemplo, las condiciones de flujo de cizalladura es una fuerza de flujo mayor de 0,6 dinas/cm². Como alternativa, la condición de flujo de cizalladura es una fuerza de al menos 2,8 dinas/cm². Adicionalmente, la condición de flujo de cizalladura es una fuerza de al menos 9,0 dinas/cm². En algunos aspectos, el fluido se mueve a través de la membrana de forma que se alcanza la tensión de corte fisiológica en la superficie. A continuación se determina la interacción entre la fase sólida y las células. La interacción entre las células de la muestra de fluido y la fase sólida indica que la célula es una célula madre.

También se describe en el presente documento un método para aislar células madre. El método incluye proveer un polipéptido de selectina en una fase sólida y poner en contacto la fase sólida con una muestra de fluido que contiene una suspensión de células. Las células que se adhieren a la fase sólida se recuperan después. Las células adheridas a la fase sólida se pueden recuperar por cualquier método conocido en la materia (por ejemplo, mediante quelación de iones con EDTA diluido y/o aplicación de una fuerza de cizalladura alta). Las células unidas recuperadas de la superficie de la transferencia se pueden recolectar y analizar su fenotipo o sus funciones biológicas después de la elución. El ligando inmovilizado en la matriz puede reutilizarse para comparar interacciones dentro de varios grupos de células o manipularse *in situ* para definir las características de la población celular que se investiga.

La interacción entre las células y la fase sólida puede ser, por ejemplo, rodamiento, unión firme o interacción específica. En algunos aspectos, la interacción específica se determina por el coeficiente de afinidad. Por ejemplo, una interacción específica es una interacción que tiene una K_d en el intervalo de 0,1 mM a 7 mM. Preferiblemente, la K_d tiene que ser mayor de 1 mM.

Una interacción célula/agente o, como alternativa, una interacción célula/fase sólida puede determinarse por ejemplo, por inspección visual al microscopio, colorimétricamente, fluorométricamente, por citometría de flujo o usando una prueba de cámara de flujo de placas paralelas. Como alternativa, la interacción se analiza marcando las células, el polipéptido HCELL o el agente usando marcadores fluorescentes, biotina, enzimas como la fosfatasa

alcalina, peroxidasa de rábano o beta-galactosidasa, isótopos radioactivos u otros marcadores conocidos en la materia. El marcador puede ser añadido a las células, al polipéptido HCELL o al agente antes o subsecuentemente a poner en contacto la población celular a estudio con el agente. La membrana o fase sólida puede ser objeto de análisis espectrofotométrico o radiográfico para cuantificar el número que interacciona con el polipéptido selectina de la fase sólida.

Asimismo, los inventores han descrito métodos de tratamiento de trastornos celulares, tales como trastornos hematopoyéticos, cáncer o trastornos susceptibles al tratamiento con una célula madre (es decir, terapia con células madre), tales como infarto de miocardio, enfermedad de Parkinson, diabetes, distrofias musculares congénitas, ictus, trastornos genéticos/congénitos (por ejemplo, osteogénesis imperfecta) y trastornos hepáticos en un mamífero, por ejemplo un ser humano, administrando las células aisladas de los métodos descritos anteriormente.

Métodos para aumentar la afinidad del ligando para E-selectina/L-selectina

Asimismo, los inventores describen en el presente documento un método para aumentar la afinidad de una célula por la E-selectina y/o L-selectina, proporcionando una célula y poniendo en contacto la célula con uno o más agentes que aumenten la expresión o actividad del polipéptido HCELL en la célula.

La célula puede ser cualquier célula capaz de expresar el polipéptido HCELL. Por ejemplo la célula puede ser una célula madre (por ejemplo, una célula pluripotencial). Una célula puede ser de origen mesodérmico, ectodérmico o endodérmico. Preferentemente, una célula de origen mesodérmico. Más preferentemente, una célula es una célula progenitora hematopoyética. La población celular que se expone a, es decir, contacta con, el compuesto puede ser cualquier número de células, es decir, una o más células, y puede ser provista *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Los agentes apropiados pueden ser, por ejemplo, un polipéptido, un ácido nucleico. Por ejemplo puede ser un polipéptido CD44, glucosiltransferasa o glucosidasa, un ácido nucleico que codifique un polipéptido CD44, glucosiltransferasa o glucosidasa y, derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Un ácido nucleico que aumente la expresión de un ácido nucleico que codifique un polipéptido CD44, glucosiltransferasa o glucosidasa, incluye, por ejemplo, promotores, amplificadores. El ácido nucleico puede ser endógeno o exógeno.

Las fuentes apropiadas de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido CD44 incluyen por ejemplo el ácido nucleico humano CD44 (y las secuencias proteicas codificadas) disponibles como GenBank, números de acceso LO5407 y CAA40133, respectivamente. Otras fuentes incluyen ácido nucleico humano CD44 y secuencias de proteínas y se muestran en GenBank con los números de acceso U35632 y P160079, respectivamente, y se refieren en el presente documento con la referencia en su integridad. Fuentes adecuadas de ácidos nucleicos que codifican polipéptido glucosiltransferasa incluyen por ejemplo el ácido nucleico glucosiltransferasa humano (y las secuencias de proteínas codificadas) disponibles como GenBank N.º de registro AJ276689 y CAB81779, respectivamente. Fuentes apropiadas de ácidos nucleicos que codifican polipéptido glucosidasa incluyen por ejemplo el ácido nucleico glucosidasa humano (y las secuencias de proteína codificadas) disponible como GenBank números de acceso AJ278964 y CAC08178, respectivamente. El uso de otros polipéptidos CD44 glucosiltransferasa o glucosidasa, de CD44 y ácidos nucleicos conocidos en el arte están también en el ámbito de la invención.

El agente se puede exponer a la célula directamente (es decir, la célula es expuesta directamente al ácido nucleico o al vector que contiene el ácido nucleico) o indirectamente.

La expresión de HCELL puede medirse a nivel del ácido nucleico o de la proteína. La expresión de los ácidos nucleicos puede medirse a nivel del ARN usando cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, se puede realizar análisis por "hibridación Northern" para determinar la expresión de genes usando sondas que reconozcan específicamente una o más secuencias. Como alternativa, la expresión se puede medir usando pruebas de tipo RT PCR. La expresión se puede medir también a nivel de proteína, es decir, midiendo los niveles de polipéptidos codificados por los productos de los genes. Dichos métodos son bien conocidos en el arte e incluyen, por ejemplo, inmunoensayos basados en anticuerpos frente a proteínas codificadas por los genes.

La actividad de HCELL puede medirse por ejemplo por la actividad de unión a L-selectina o E-selectina.

Métodos para aumentar el potencial de injerto de una célula

En el presente documento los inventores describen métodos para aumentar el potencial de injerto de una célula. Por aumentar el potencial de injerto se entiende que la célula tiene una mayor tasa de supervivencia después del trasplante en comparación con una célula no tratada.

Una célula puede ser de origen mesodérmico, ectodérmico o endodérmico. Preferentemente, la célula es una célula madre. Más preferentemente, la célula es de origen mesodérmico. Por ejemplo, la célula es una célula progenitora hematopoyética.

Los inventores también describen método para aumentar el potencial de injerto de una célula, disponiendo esa

célula y poniéndola en contacto con uno o más agentes que aumenten la expresión de HCELL en la superficie celular o aumenten la actividad de este polipéptido en la superficie de la célula. Los inventores describen adicionalmente un método para aumentar los niveles de células madre injertadas en un sujeto, por ejemplo, humano, mediante la administración al sujeto de un agente que aumente la expresión de HCELL en la superficie celular en una o más células madre del sujeto. El agente puede administrarse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*,

Los inventores también describen un método de aumentar el potencial de injerto de una población celular proporcionando un polipéptido de selectina, por ejemplo, E-selectina o L-selectina, inmovilizado en una fase sólida, por ejemplo vidrio, plástico o membrana, y poniendo en contacto la fase sólida con una muestra de fluido que contiene una suspensión de células de ensayo. En algunos aspectos, la muestra de fluido se mueve. Por muestra de fluido en movimiento se quiere decir que la muestra fluye a través de la superficie de la membrana de un modo unidireccional. Las interacciones entre la muestra de fluido en flujo y el ligando inmovilizado se pueden examinar bajo una amplia gama de condiciones de flujo definidas, que van desde incubación estática hasta niveles fisiológicos de flujo de cizalladura, condiciones estáticas y aplicación seriada de condiciones estáticas o de cizalladura, y a niveles suprafisiológicos de cizalladura. Por ejemplo, las condiciones de flujo de cizalladura es una fuerza de al menos 0,6 dinas/cm². Como alternativa, la condición de flujo de cizalladura es una fuerza de al menos 2,8 dinas/cm². Adicionalmente, la condición de flujo de cizalladura es una fuerza de al menos 9,0 dinas/cm². En algunos aspectos, el fluido se mueve a través de la membrana de forma que se alcanza la resistencia a la cizalladura fisiológica en la superficie. Las células que se adhieren a la fase sólida se recuperan después.

Las células adheridas a la fase sólida se pueden recuperar por cualquier método conocido en la materia (por ejemplo, mediante quelación de iones con EDTA diluido y/o aplicación de una fuerza de cizalladura alta). Las células unidas recuperadas de la superficie de la transferencia se pueden recolectar y analizar su fenotipo o sus funciones biológicas después de la elución. El ligando inmovilizado en la matriz puede reutilizarse para comparar interacciones dentro de varios grupos de células o manipularse *in situ* (como se indica más adelante) para definir las características de la población celular que se investiga. También está descrito un método de aumentar los niveles de células madre injertadas en un sujeto, administrando a un sujeto una composición que incluya las células aisladas de acuerdo a los métodos que se han explicado anteriormente.

Los agentes apropiados pueden ser, por ejemplo, un polipéptido, un ácido nucleico. Por ejemplo un agente puede ser un polipéptido CD44, glucosiltransferasa o glucosidasa, un ácido nucleico que codifique un polipéptido CD44, un polipéptido glucosiltransferasa o un polipéptido glucosidasa o un ácido nucleico que aumente la expresión de un ácido nucleico que codifique un polipéptido CD44, un polipéptido glucosiltransferasa o un polipéptido glucosidasa y, derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos. Un ácido nucleico que aumente la expresión de un ácido nucleico que codifique un polipéptido CD44, un polipéptido glucosiltransferasa o un polipéptido glucosidasa incluye, por ejemplo, promotores, amplificadores. El ácido nucleico puede ser endógeno o exógeno.

Las fuentes apropiadas de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido CD44 incluyen por ejemplo el ácido nucleico humano CD44 (y las secuencias proteicas codificadas) disponibles como GenBank, números de acceso LO5407 y CAA40133, respectivamente. Otras fuentes incluyen ácido nucleico humano CD44 y secuencias de proteínas y se muestran en GenBank con números de registro U35632 y P160079, respectivamente. Las fuentes apropiadas de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido glicosiltransferasa incluyen por ejemplo el ácido nucleico humano de la glicosiltransferasa (y las secuencias proteicas codificadas) disponibles como GenBank, números de acceso AJ276689 y CAB81779, respectivamente. Las fuentes apropiadas de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido glicosidasa incluyen por ejemplo el ácido nucleico humano de glicosidasa (y las secuencias proteicas codificadas) disponibles como GenBank, números de acceso AJ278964 y CAC08178, respectivamente. Otros polipéptidos CD44, glicosiltransferasa o glicosidasa y ácidos nucleicos conocidos en la materia también se pueden usar.

El sujeto es, preferentemente, un mamífero. El mamífero puede ser, por ejemplo, un ser humano, un primate no humano, un ratón, un perro, un gato, un caballo o una vaca. Adicionalmente, el sujeto sufre o está en riesgo de desarrollar una trastorno hematopoyético, (por ejemplo, leucemia), cáncer, o trastornos inflamatorios, incluyendo trastornos inflamatorios crónicos, (por ejemplo, artritis reumatoide).

Un mamífero que sufre de o está en riesgo de desarrollar una trastorno hematológico (por ejemplo, leucemia), cáncer, o trastornos inflamatorios, incluyendo trastornos inflamatorios crónicos, (por ejemplo, artritis reumatoide) puede ser identificado mediante la detección de un factor de riesgo, por ejemplo, género, edad, historia previa de tabaquismo, predisposición familiar, atribuidos al trastorno particular. Como alternativa, un mamífero que sufre de o está en riesgo de desarrollar un trastorno hematológico, (por ejemplo leucemia), cáncer, o trastornos inflamatorios, incluyendo trastornos inflamatorios crónicos, (por ejemplo, artritis reumatoide) puede ser identificado mediante métodos conocidos en el arte para diagnosticar el trastorno particular.

Población de células para su uso en el tratamiento

En el presente documento, los inventores describen una población de células, en la que dichas células son células madre, células progenitoras hematopoyéticas o células de leucocitos para su uso en el tratamiento de trastornos hematopoyéticos, trastornos inflamatorios, trastornos genéticos, cáncer o trastornos susceptibles de tratamiento con

una célula madre, teniendo dichas células un polipéptido glicosilado, comprendiendo dicho polipéptido glicosilado comprende una cadena principal del polipéptido CD44 que muestra glicanos sialilados, fucosilados que se unen E-selectina y a L-selectina, teniendo la población un mayor nivel de expresión del polipéptido glicosilado en relación con poblaciones nativas de células de ese tipo, con la condición de que la población no es una población de células madre embrionarias.

Una célula puede ser de origen mesodérmico, ectodérmico o endodérmico. Preferentemente, una célula es de origen mesodérmico. Más preferentemente, una célula es una célula progenitora hematopoyética.

En una realización, el polipéptido glicosilado o la estructura principal del polipéptido CD44 glicosilado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o comprende la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % similar a la SEQ ID NO: 1.

En otra realización, el polipéptido glicosilado o la estructura principal del polipéptido CD44 glicosilado muestra glicanos fucosilados sialilados reactivos a HECA-452.

Métodos para tratar trastornos hematopoyéticos

En el presente documento, los inventores también describen un método para tratar trastornos hematopoyéticos, (por ejemplo, leucemia, anemia aplásica, linfoma no Hodgkin, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, varios síndromes mielodisplásicos), en un sujeto, administrando al sujeto un agente que disminuye la expresión en la superficie celular del polipéptido HCELL en el sujeto.

Los inventores también describen un método de tratamiento de trastornos hematopoyéticos en un sujeto proporcionando sangre del sujeto y poniendo la sangre en contacto con uno o más agentes que se unen específicamente al polipéptido HCELL en las condiciones necesarias para formar un complejo entre los agentes y una célula sanguínea en la sangre. Preferentemente la célula sanguínea es cancerosa. Más preferentemente, la célula sanguínea es una célula sanguínea leucémica. Se detecta la formación del complejo y el complejo se retira de la sangre, y, se retira la célula. La sangre después se reintroduce en el sujeto.

Los agentes apropiados incluyen una proteína, un polipéptido o molécula pequeña, que se une específicamente al polipéptido HCELL. Preferentemente, un agente es un anticuerpo o un fragmento del mismo. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Por ejemplo, un agente es un anticuerpo frente a HCELL. Como alternativa, un agente es un anticuerpo anti-CD44, o un anticuerpo HECA-452. Con unión específica se quiere decir que la interacción entre la célula y el agente es suficiente para formar un complejo. El complejo se puede separar de la sangre mediante métodos conocidos en la materia, por ejemplo, citometría de flujo.

Asimismo, los inventores han descrito un método de tratamiento de trastornos hematopoyéticos en un sujeto proporcionando sangre del sujeto y un polipéptido selectina, por ejemplo E-selectina o L-selectina inmovilizados en una fase sólida, por ejemplo, de vidrio, plástico o membrana, y poniendo en contacto la fase sólida con la sangre. En algunos aspectos, la muestra de sangre se mueve. Por muestra de sangre en movimiento se quiere decir que la muestra fluye a través de la superficie de la membrana de un modo unidireccional. Las interacciones entre la muestra de sangre en el flujo y el ligando inmovilizado se pueden examinar bajo una amplia gama de condiciones de flujo definidas, que van desde incubación estática hasta niveles fisiológicos de flujo de cizalladura, condiciones estáticas y aplicación seriada de condiciones estáticas o de cizalladura, y a niveles suprafisiológicos de cizalladura. Por ejemplo, las condiciones de flujo de cizalladura es una fuerza de flujo mayor de 0,6 dinas/cm². Como alternativa, la condición de flujo de cizalladura es una fuerza de al menos 2,8 dinas/cm². Adicionalmente, la condición de flujo de cizalladura es una fuerza de al menos 9,0 dinas/cm². En algunos aspectos, la sangre se mueve a través de la membrana de forma que se alcanza la tensión de corte fisiológica en la superficie. Después, la sangre se reintroduce en el sujeto.

La extracción y reinfusión de la sangre en un sujeto se lleva a cabo mediante técnicas de plasmáferesis conocidas en la materia.

Los inventores también han descrito métodos para tratar trastornos hematopoyéticos en un sujeto administrando al sujeto un agente que se une específicamente a la glucoproteína HCELL. El agente puede ser por ejemplo un polipéptido o una molécula pequeña. Preferentemente, el agente es un anticuerpo frente a HCELL. Con unión específica se quiere decir que la interacción entre la glucoproteína HCELL y el agente es suficiente para formar un complejo. Tras la formación del complejo, el agente puede activar el complemento o mediar en la toxicidad celular, (por ejemplo, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) u otros efectos inmunológicos directos.

Como alternativa, un trastorno hematopoyético puede tratarse administrando al sujeto un agente que incluya un primer y un segundo dominios. El primer dominio incluye un compuesto que se une específicamente a la glucoproteína HCELL. Preferentemente, el primer dominio es un anticuerpo frente a HCELL o fragmento del mismo. El segundo dominio incluye una toxina unida por un enlace covalente, por ejemplo, un enlace peptídico, al primer dominio. Una toxina incluye un compuesto capaz de destruir o matar selectivamente una célula con la que entra en

contacto. Por "matar selectivamente" se entiende matar aquellas células a las que se une el primer dominio. Ejemplos de toxinas incluyen, toxina diftérica (DT) exotoxina de *Pseudomonas* (PE), ricina A (RTA), gelonina, proteína antiviral de hierba de carmín y dodecandron.

- 5 El primer y segundo dominios se pueden presentar en cualquier orden y el agente puede incluir uno o más de cada dominio.

El sujeto es, preferentemente, un mamífero. El mamífero puede ser, por ejemplo, un ser humano, un primate no humano, un ratón, un perro, un gato, un caballo o una vaca.

10

Métodos para diagnosticar o determinar la susceptibilidad a un trastorno hematológico

Los inventores también describen en el presente documento un método para diagnosticar o determinar la susceptibilidad a un trastorno hematológico en un sujeto por medio de poner en contacto una población celular derivada del sujeto con uno o más agentes que se unen específicamente a la glucoproteína HCELL. Con unión específica se quiere decir que la interacción entre la célula y el agente es suficiente para formar un complejo. Se detecta un complejo célula/agente. La presencia de un complejo indica la presencia de o la susceptibilidad del sujeto a sufrir un trastorno hematológico.

15

- 20 Los trastornos hematológicos que se pueden detectar por este método incluyen por ejemplo, anemia, neutropenia, trombocitosis, trastornos mieloproliferativos o neoplasias hematológicas.

El sujeto es, preferentemente, un mamífero. El mamífero puede ser, por ejemplo, un ser humano, un primate no humano, un ratón, un perro, un gato, un caballo o una vaca.

25

Métodos para determinar el pronóstico o eficacia del tratamiento de un trastorno hematológico

Los inventores también describen en el presente documento un método para diagnosticar o determinar la susceptibilidad a un trastorno hematológico en un sujeto por medio de poner en contacto una población celular derivada del sujeto con uno o más agentes que se unen específicamente a la glucoproteína HCELL. Con unión específica se quiere decir que la interacción entre la célula y el agente es suficiente para formar un complejo. Se detecta un complejo célula/agente. La ausencia del complejo indica un pronóstico favorable o tratamiento eficaz del trastorno hematológico en el sujeto. La presencia del complejo indica un pronóstico desfavorable o tratamiento no eficaz del trastorno hematológico en el sujeto.

30

35

Por "eficaz" se entiende que el tratamiento ha conseguido disminuir el trastorno hematológico en el sujeto. Cuando el tratamiento se aplica profilácticamente, "eficaz" significa que el tratamiento retrasa o previene el trastorno hematológico.

- 40 Los trastornos hematológicos que se pueden detectar por este método incluyen por ejemplo, anemia, neutropenia, trombocitosis, trastornos mieloproliferativos o neoplasias hematológicas.

El sujeto es, preferentemente, un mamífero. El mamífero puede ser, por ejemplo, un ser humano, un primate no humano, un ratón, un perro, un gato, un caballo o una vaca.

45

Métodos para tratar trastornos inflamatorios

Los inventores también describen en el presente documento un método de tratamiento de trastornos inflamatorios en un sujeto, mediante la administración a un sujeto de una glicoproteína de HCELL o fragmento de la misma.

50

Los trastornos inflamatorios incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide (AR), enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y asma.

Composiciones farmacéuticas que incluyen polipéptidos HCELL, polipéptidos de fusión o ácidos nucleicos que codifican los mismos

55

La invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de inmunoglobulina y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 60 La invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de inmunoglobulina y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, cáncer o un trastorno hematopoyético en un sujeto.

65

Los polipéptidos HCELL, o moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión y células aisladas como se describe en el presente documento (también denominados en el presente documento "Terapéuticas" o "compuestos activos") y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos, pueden incorporarse en

composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración. Normalmente, dichas composiciones comprenden la molécula de ácido nucleico, proteína, célula o anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, se pretende que "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluya todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Vehículos adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en el campo. Ejemplos preferidos de estos vehículos o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución dextrosa, y seroalbúmina humana al 5 %. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijados. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto cuando alguno de los medios o agentes convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. En las composiciones también pueden incorporarse compuestos activos suplementarios.

Los agentes activos divulgados en el presente documento también pueden formularse como liposomas. Los liposomas se preparan por métodos conocidos en la materia, tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y las patentes de Estados Unidos n.º 4.485,045 and 4.544,545. Los liposomas con tiempo de circulación aumentado se divulgan en la patente de Estados Unidos n.º 5.013,556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamida derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruden a través de filtros con un tamaño de poro definido para obtener liposomas con el diámetro deseado.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración destinada. Ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral por ejemplo intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los componentes siguientes: un diluyente estéril tal como agua para inyectables, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetracético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral se puede introducir en ampollas, jeringuillas desechables o viales multidosis de vidrio o de plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (cuando sean hidrosolubles) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los transportadores adecuados incluyen solución fisiológica salina, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida de modo que se pueda introducir con facilidad en las jeringuillas. Debe ser estable en las condiciones de la fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede conseguir mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede efectuar incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en lo que antecede, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados en lo que antecede. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación son secado al vacío y liofilización, que da un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución del mismo previamente filtrada para esterilizar. Las composiciones orales incluyen en general un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina, comprimidos oblongos o comprimir en comprimidos. Para el fin de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo fluido para su uso como colutorio, en el que el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se enjuaga y se expectora o se traga. Se pueden incluir como parte de la composición compuestos de

unión o materiales coadyuvantes farmacéuticamente compatibles. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz, un lubricante tal como estearato de magnesio o esteroides; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta piperita, salicilato metílico o sabor a naranja.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos se liberan en forma de un pulverizador en aerosol a partir de un recipiente o dispensado presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear. En general, estos penetrantes se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales de bilis y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa se puede conseguir mediante el uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, salvas, geles o cremas, como en general se conocen en la técnica.

Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (p. ej., con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para liberación rectal.

En una forma de realización, los compuestos activos se preparan con transportadores que protegerán al compuesto frente a la rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes y sistemas de liberación microencapsulada. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Procedimientos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones de liposomas (incluidos los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales frente a antígenos virales) también se pueden usar transportadores farmacéuticamente aceptables. Éstos se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos para el experto en la técnica, por ejemplo como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.522,811.

En algunas realizaciones, las composiciones orales o parenterales se formulan en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a unidades físicamente pequeñas adaptadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención viene dictada y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico concreto que se debe conseguir y de las limitaciones inherentes en la técnica de formar tal compuesto activo para el tratamiento de individuos.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden insertarse en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica se pueden administrar a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.328.470) o por inyección estereotáxica (véase, por ejemplo, Chen, *et al.*, 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3054-3057) 3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que se adsorbe el vehículo de administración del gen. Como alternativa, en los casos en que el vector de liberación del gen completo se puede producir intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de liberación del gen.

Se pueden preparar, si se desea, preparaciones de liberación continua. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, en las que las matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de Estados Unidos n.º 3.773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D - (-) -3-hidroxibutírico. Mientras los polímeros como el acetato de etilvinilo y el ácido de ácido glicólico láctico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteína durante períodos de tiempo más cortos.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un contenedor, envase o dispensador junto con instrucciones de administración.

La invención se describirá adicionalmente en los ejemplos siguientes, que no limitan el ámbito de la invención

descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1: Identificación de glucoproteínas en la membrana reactivas a HECA-452 sobre células hematopoyéticas humanas

Se realizó un SDS-PAGE y análisis de transferencia de tipo *Western* del o los epítipo reactivos a HECA-452 en proteínas de la membrana de varias líneas celulares hematopoyéticas humanas. Preparación de las células

Se propagaron líneas celulares hematopoyéticas humanas (KG1a, HL60, RPMI-8402 y K562) y la línea celular endotelial de médula ósea BMEC-1 (Candal et al, 1996) en RPMI1640/10 % FBS/1 % penicilina-estreptomicina (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY). Se aislaron blastos de leucemia circulantes en fresco mediante centrifugación con densidad de gradiente Ficoll-Hypaque (1,077-1,0800 g/ml) (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH) de sangre periférica de pacientes en los que representaban >80 % de todos los leucocitos circulantes. Se extrajeron células de médula ósea normales de los cuerpos vertebrales de donantes de órganos de cadáver obtenidos con el consentimiento de las familias y con la cooperación del New England Organ Bank (Newton, MA). Las células mononucleares de la médula ósea se aislaron mediante centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (1,077-1,0800 g/ml). Las células de la médula ósea se separaron en subpoblaciones CD34+ y linaje-/CD34- usando una columna de enriquecimiento de progenitores humanos para selección negativa StemSep™ (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, BC Canada) o, como alternativa, usando selección positiva para células CD34+ o para otras subpoblaciones de médula ósea (monocitos CD14+), granulocitos (CD15+), células B (CD19+) o células T (CD3+) mediante separación por microesferas inmunomagnéticas (Milteny Bistec, Auburn, CA). Las poblaciones celulares CD34+/CD44+, CD34+/CD44- y CD34-/CD44+ se aislaron mediante clasificación celular en un aparato MoFlo (Cytomation) usando un anticuerpo monoclonal anti-CD34 (HPCA-2) (Beckton-Dickinson) conjugado con fluorocromo y anticuerpo monoclonal anti-CD44 (Hermes-1) (regalo de la Dra. Brenda Sandmaier, Fred Hutchinson Cancer Research Center).

SDS-PAGE y transferencias Western

Se aislaron preparaciones de membrana de HPC como se ha descrito previamente (Sackstein y Dimitroff, 2000). Para el SDS-PAGE y la transferencia Western, las preparaciones de membrana se diluyeron en tampón de muestra reductor y se separaron en geles SDS-PAGE 6-9 %. En los casos indicados, las proteínas de membrana también se trataron con N-glucosidasa F (Roche Molecular Biomedicals) (8 U/ml durante 24 h) o neuraminidasa de *Vibrio Cholerae* (Roche Molecular Biochemicals) (0,1 U/ml H/H/Ca++ durante 1 hora a 37 °C) como se ha descrito previamente (Sackstein y Dimitroff, 2000). Las proteínas de membrana resueltas se transfirieron a una membrana de PVDF Sequi-blot™ (Bio-rad, Inc., Hercules, CA) y se bloquearon con PBS/Tween-20/20 %FBS durante 1 hora a 4 °C. Las transferencias se incubaron con anticuerpo monoclonal de rata HECA-452 (Pharmingen, San Diego, CA) (1,2 µg/ml PBS) o anticuerpo monoclonal 4H10 anti-PSGL-1 (Genetics Institute) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron inmunotransferencias de control de isotipo con IgM de rata o IgG de ratón en paralelo para evaluar las proteínas reactivas no específicas. Después de 3 lavados con PBS/0,1 % de Tween-20, las transferencias se incubaron con anticuerpos IgM anti-rata de conejo conjugados con PA (1:400) o con IgG anti-ratón de cabra conjugados con PA (1:8000) según el anticuerpo primario. Después se añadió el sustrato para PA, Western Blue® (Promega, Madison, WI), para revelar las transferencias.

Como se ilustra en la Figura 1A, se detectaron numerosas y distintas bandas reactivas a HECA-452 en el SDS-PAGE de la proteína de membrana aislada de células KG1a. A pesar de haber cargado 10 veces menos proteína de membrana de KG1a que de proteína de membrana celular de HL60, RPMI-8402 o K562, las células KG1a contenían marcadamente más tinción de HECA-452 mostrada como varias bandas de la proteína componente. Solo se detectó una amplia banda de aproximadamente 140 kDa en las células HL60, la cual corresponde a la especie de monómero de PSGL-1 por inmunotransferencia (Figura 1A). No hubo proteínas de membrana reactivas a HECA-452 en las células RPMI-8402 o H562, aunque se detectó PSGL-1 en las transferencias Western de estas células usando anticuerpo anti-PSGL-1, 4H10 (Dimitroff et al., 2000). Este hallazgo sugirió que estas células carecían del epítipo apropiado para la unión de HECA-452 y, como mínimo, la especie de PSGL-1 de unión a E-selectina.

Ejemplo 2: Valoración de la unión a E-selectina de células hematopoyéticas humanas en condiciones de flujo de cizalladura bajo

Para examinar si la expresión de HECA-452 por líneas celulares hematopoyéticas humanas se correlaciona con la actividad de ligando de E-selectina, se realizaron estudios en cámara de flujo de placas paralelas para valorar la unión a E-selectina en condiciones de flujo definidas.

Utilizando monocapas celulares

Se examinaron interacciones de adhesión mediadas por E-selectina, bajo tensión de corte definida, entre monocapas de células hematopoyéticas y suspensiones de células CHO-E (células de ovario de hámster chino transfectadas con ADNc de longitud completa que codifica E-selectina humana) en flujo. Las construcciones de CHO-E y de vector vacío (CHO-simulado) se mantuvieron en MEM 10 % PBS/ 1 % de penicilina/estreptomicina (Life

Technologies, Inc.) y HAM's F-12 (Cellgro, Inc.) /5 % de FCS/1 % de penicilina/estreptomicina, respectivamente. Se visualizó la adherencia y rodamiento de las células CHO-E sobre las monocapas de células hematopoyéticas en tiempo real por microscopio con vídeo usando la cámara de flujo de placas paralelas. Antes de la experimentación, las células CHO-E se recogieron con EDTA 5 mM, se lavaron 2 veces en HBSS y se suspendieron a 1×10^7 /ml en HBSS/10 mM HEPES/2 mM CaCl_2 (H/H/CC).

Se prepararon grupos de control negativos mediante la adición de EDTA 5 mM al tampón ensayo H/H (para quelar el Ca^{++} requerido para la unión), tratando las células CHO-E con anticuerpos anti-E-selectina (clon 68-5H1 1; Pharmingen) (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o usando transfectantes de vectores vacíos-CHO (células CHO simuladas). Para preparar monocapas de células hematopoyéticas confluentes >90 %, se centrifugaron suspensiones de células (KG1a, HL60, K562, o RPMI 8402) a 2×10^6 /ml en RPMI1640 sin bicarbonato $\text{Na}/2$ % de FBS en placas de 6 pocillos a 5×10^6 /pocillo y después se fijaron con glutaraldehído al 3 %. Los grupos de aldehído reactivos se bloquearon en lisina 0, 2M, y las células sembradas se suspendieron H/H/ Ca^{++} . En paralelo, también se pretrataron las células con neuraminidasa de *Vibrio Cholerae* (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ H/H/ Ca^{++} durante 1 hora a 37 °C) o con endopeptidasa O-sialoglucoproteína (OSGE) (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ H/H/ Ca^{++} durante 1 hora a 37 °C; Accurate Chemicals, Westbury, NY), respectivamente. Se colocaron monocapas de células en una cámara de flujo de placas paralelas y se perfundieron células CHO-E/simuladas dentro de la cámara. Después de dejar que las células CHO-E o CHO-simuladas entraran en contacto con las monocapas celulares, el caudal se ajustó para ejercer una tensión de corte de 2, 8 dinas/ cm^2 . El número de células CHO-E/simuladas en rodamiento sobre cada monocapa se midió en un marco de 5 campos independientes a un aumento de 10X en múltiples experimentos. Se realizó un mínimo de 3 experimentos y los resultados se expresaron como media $\pm$ desviación estándar.

Como alternativa, usando BMEC primarias humanas aisladas recientemente cultivadas como se ha descrito previamente (Rafii *et al.*, 1994), se sembraron BMEC de subcultivos de no más de 5 pases a 10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos hasta llegar a 90-100 % de confluencia, se estimularon IL-1 α (40 U/ml) durante 4 horas para activar la expresión de E-selectina (cuya expresión se midió mediante análisis de citometría de flujo). Los cultivos vivos se colocaron después en la cámara de flujo de placas paralelas y se perfundieron las células hematopoyéticas (10^7 /ml en H/H/ Ca^{++}) en la cámara sobre las BMEC. La adherencia y rodamiento de las células hematopoyéticas se visualizó a 2, 8 dinas/ cm^2 . Las BMEC no activadas con IL-1 α y las BMEC activadas con IL-1 α tratadas con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo monoclonal anti E-selectina (clon 68-5H11) sirvieron como controles para confirmar la especificidad de la adhesión mediada por E-selectina. El rodamiento celular se cuantificó y se expresó como se ha descrito anteriormente.

Utilizando inmunoprecipitados Inmovilizados

Se inmunoprecipitó CD44 de lisados celulares no tratados o de lisados tratados con N-glucosidasa-F (0,8 U/ml), neuraminidasa de *Vibrio Cholerae* (0,1 U/ml) o una fucosidasa-L (80 mU/ml), y se inmunoprecipitó PSGL-1 de lisados celulares no tratados como se ha descrito previamente (Sackstein y Dimitroff, 2000; Dimitroff *et al.*, 2000).

Los inmunoprecipitados de CD44 o PSGL-1 se transfirieron a placas de petri, se fijaron con glutaraldehído al 3 % y se incubaron en lisina 0,2M para bloquear los grupos aldehído no reactivos, y posteriormente la unión inespecífica se previno incubando en FBS al 100 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Los puntos fijados se trataron también con neuraminidasa de *Vibrio cholerae* (en medio de ensayo 0,1 U/ml), que se colocó cubriendo los puntos y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Las placas con las proteínas se colocaron en la cámara de flujo de placas paralelas y se perfundieron en una cámara (2×10^6 /ml H/H/ Ca^{++}) células CHO-E, CHO-P (CHO transfectadas establemente con ADNc humano que codifica selectina-P de longitud completa), células CHO-P tratadas con anticuerpo monoclonal anti-selectina-P con función de bloqueo (clon AK-4; Pharmingen) (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), células CHO-E tratadas con anticuerpos anti-E-selectina con función de bloqueo (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (clon 68-5H1 1) o transfectantes falsos, a un caudal de 0,2 ml/min hasta que las células contactaron con el sustrato. Después, el caudal se aumentó hasta alcanzar una tensión de corte de 2, 8 dinas/ cm^2 . Se determinó la frecuencia de las células rodando por campo de aumento 100x, y los datos se expresaron como media $\pm$ desviación estándar de 8 campos visualizados de un mínimo de 3 experimentos.

Se observó la adherencia y rodamiento de células de ovario de hámster chino que expresan niveles altos de E-selectina (CHO-E) en monocapas de células KG1a y HL60 fijadas con glutaraldehído a 2,8 dinas/ cm^2 (Figura 1B). Las células CHO transfectadas de forma simulada (CHO-simuladas) no mostraron rodamiento. El rodamiento de las células CHO-E fue 2 veces mayor sobre las células KG1a que sobre las células HL60 y se inhibió completamente añadiendo EDTA 5 mM al medio de ensayo, preincubando las células CHO-E con anticuerpos anti-E-selectina o pretratando las células KG1a o HL60 con neuraminidasa de *Vibrio cholerae* (que elimina los ácidos siálicos terminales). No hubo actividad de ligando de E-selectina en las líneas celulares RPMI-8402 y K562, cuyas proteínas de membrana no contienen epítomos HECA-452. Sorprendentemente, la actividad de ligando para E-selectina de las células KG1a y HL60 no se inhibió incubando las células con HECA-452 a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y no se eliminó mediante pretratamiento con OSGE (Figura 1B), aunque la bioactividad de OSGE se confirmó mediante desaparición del epítipo OSGE-sensible, QBEND-10, en las células CD34 KG1a medido por citometría de flujo.

Para analizar la interacción entre HPC humanas y E-selectina expresada naturalmente en células de importancia fisiológica, se utilizaron células endoteliales de la microvasculatura de la médula ósea aisladas en fresco (BMEC).

En condiciones de flujo de cizalladura fisiológicas, se observó rodamiento de células KG1a y HL60 sobre monocapas vivas de BMEC activadas con IL-1 α . Coherente con los resultados de los experimentos con células CHO-E para evaluar la actividad de ligando de E-selectina de HPC, las células KG1a poseían una capacidad para rodar sobre E-selectina en BMEC activadas con IL-1 α 4 veces mayor que HL60, mientras que las células RPMI-8402 y K562 poseían una mínima actividad de ligando de E-selectina (Figura 2). Las actividades de ligando para E-selectina de las células KG1a y HL60 no se observaron sobre BMEC activadas con IL-1 α ni sobre BMEC activadas con IL-1 α tratadas con un anticuerpo monoclonal anti-E-selectina con función de bloqueo.

Ejemplo 3: Evaluación de ligandos de glucoproteínas para E-selectina de células hematopoyéticas humanas usando un ensayo de rodamiento con transferencia

Para examinar la actividad de ligando de E-selectina de todas las proteínas de membrana de KG1a reactivas a HECA-452, se evaluaron las interacciones entre células enteras que expresan selectina y proteínas inmovilizadas en transferencias Western en condiciones de flujo de cizalladura (Dimitroff et al., 2000).

El ensayo de rodamiento por transferencia se realizó como se ha descrito previamente (Dimitroff et al., 2000). Brevemente, se aislaron transfectantes de CHO-E, CHO-P o CHO-simuladas como se ha descrito anteriormente, se lavaron 2 veces con HBSS y se suspendieron a 10^7 /ml en HBSS/HEPES 10 mM/CaCl₂ mM (H/H/Ca++) /glicerol al 10 %. Las transferencias Western de preparaciones de membranas HPC teñidas con HECA-452 se volvieron transparentes incubando en H/H/Ca++/glicerol al 10 %. Las transferencias se colocaron después en la cámara de flujo de placas paralelas, y se perfundieron los transfectantes CHO (2×10^6 /ml) en la cámara. Después de dejar que las células entraran en contacto con las membranas de transferencia, se ajustó el caudal para ejercer una tensión de corte de 3, 8 dinas/cm². Se consideró la viscosidad del medio de ensayo con glicerol al 10 % para calcular los valores de tensión de corte. El número de células en rodamiento sobre cada región de bandas y entre bandas inmunoteñidas se cuantificó con un aumento de 100x dentro de cada campo de visión en un monitor de video usando marcadores de peso molecular (Kaleidoscope Molecular Weight Markers, Bio-Rad Lab.; véase Blue® de Novex, Inc.) como guías para ayudar a alinear y visualizar los pesos moleculares aparentes de las proteínas de interés. Se realizó un mínimo de 3 experimentos y los resultados se expresaron como media $\pm$ SD de células en rodamiento/campo de 100x aumentos. Se prepararon controles negativos mediante la adición de EDTA 5 mM al tampón de ensayo CHO-E H/H para quelar el Ca++ necesario para la unión, pretratando las células CHO-E con anticuerpos anti E-selectina (clon 68-5H1 1; 10 μ g/ml) o valorando la capacidad de las células CHO-simuladas para interaccionar con las proteínas inmovilizadas.

Se observó actividad de ligando para E-selectina en las bandas teñidas con HECA-452 en 100, 120, 140, 190 y 220 kDa, pero no a 74 kDa (Figura 3A). Los transfectantes CHO-simuladas no mostraron interacciones con ninguna banda. Se demostró la especificidad de E-selectina mediante la eliminación del rodamiento de las células CHO-E en presencia de EDTA 5 mM o anticuerpos anti-E-selectina con función de bloqueo. En las células HL60, el rodamiento de CHO-E se observó solamente sobre la amplia banda de 145 kDa teñida con HECA-452 (por ejemplo, PSGL-1/CLA). Para determinar si los determinantes de unión a E-selectina residen en los N-glicanos, la proteína de membrana de KG1a se trató con N-glucosidasa-F. Las proteínas Des-N-glucosiladas se separaron por SDS-PAGE y se analizaron para determinar la reactividad con HECA-452 y la actividad de ligando para E-selectina. El tratamiento con N-glucosidasa-F disminuyó marcadamente la tinción con HECA-452 (Figura 3B) y suprimió completamente el rodamiento de células CHO-E sobre todas las proteínas en la membrana, indicando que en las células KG1a todos los determinantes de glucoproteínas para la unión con E-selectina están expresados exclusivamente en los N-glicanos.

Ejemplo 4: Identificación y caracterización de HCELL

Se siguió la expresión de epítopos HECA-452 en la proteína de membrana de 98 kDa de KG1a después de escisiones secuenciales de los geles SDS-PAGE con diferentes porcentajes de acrilamida. Después de cada ronda de purificación con SDS-PAGE, la proteína de 98 kDa mantenía su capacidad de sostener el rodamiento de linfocitos en ensayo de flujo hidrodinámico basada en transferencias. Después de tres rondas de purificación con SDS-PAGE, se detectó una tenue banda a ~190 kDa teñida con HECA-452, además de la banda de 98 kDa, lo que sugiere que alguna agregación de la proteína de 98 kDa puede haberse producido en el procedimiento de aislamiento. El fragmento de gel de 98 kDa teñido con azul Coomassie se sometió a análisis por espectrometría de masas de fragmentos de péptidos digeridos con tripsina. El mapa del péptido primario correspondía con el de la forma estándar de CD44, que previamente de había mostrado que se expresaba en células KG1a. Usando anticuerpos monoclonales frente a CD44 (A3D8 IgG de ratón, o Hermes-1 IgG de rata) junto a HECA-452, los inventores realizaron inmunotransferencia de la banda de 98 kDa purificada después del tercer aislamiento del gel con HECA-452, A3D8 o Hermes-1 (Figura 8). Cada anticuerpo detectó la especie de 98 kDa así como la débil banda a ~190 kDa, que se piensa que representa proteína agregada. La correlación entre los anticuerpos monoclonales HECA-452 y anti-CD44 indicaba que la glucoforma de CD44 en KG1a contiene el o los determinantes de carbohidratos HECA-452.

Para distinguir la banda PSGL-1/CLA celular de KG1a de otras bandas reactivas, las transferencias de PSGL-1 y de otras proteínas de membrana de KG1a purificados por inmunofinidad se sometieron a inmunotinción con HECA-

452 o con anti-PSGL-1 (Figura 3C). Las células KG1a expresan las isoformas monomérica y dimérica de PSGL-1, representadas por las proteínas reactivas a HECA-452 de 140 y 220 kDa (Figura 3C). Así, las bandas a 100, 120 y 190 kDa reactivas a HECA-452 que sostienen el rodamiento de células CHO-E, correspondían a proteínas no-PSGL-1.

Para determinar si las modificaciones de CD44 de tipo N-glicano específicas confieren actividad de ligando para E-selectina, se evaluaron CD44 purificados por inmunoadfinidad de proteínas de KG1a para comprobar su capacidad de actuar como ligando para E-selectina en ensayos de rodamiento por transferencia. Como se muestra en la figura 3D, CD44 de KG1a mostró reactividad frente a HECA-452 y poseía actividad de ligando para E-selectina. El tratamiento de CD44 con N-glucosidasa-F redujo marcadamente la reactividad a HECA-452 y suprimió completamente el rodamiento de células CHO-E (Figura 3D). La inmunoprecipitación exhaustiva de CD44 (3 rondas) tuvo como resultado la desaparición de la molécula de CD44 teñible a 100 kDa (inmunotransferencia de Hermes-1 e inmunotransferencia de HECA-452) y de toda la actividad de ligando para E-selectina en las bandas de 100 kDa y 190 kDa (Figuras 4A y 4B). Además, se produjo una disminución del 55 % en la actividad de ligando para E-selectina en la banda de 120 kDa después de tres rondas de inmunoprecipitación (Figura 4B). Notablemente, no hubo diferencias en la tinción con HECA-452 ni en la actividad de ligando para E-selectina de la especie monomérica de PSGL-1 de 140 kDa después de la retirada de CD44.

Para explorar adicionalmente la actividad de ligando a E-selectina de CD44, los inventores inmunoprecipitaron directamente CD44 de líneas celulares hematopoyéticas humanas y analizaron la unión de las células CHO-E en la cámara de flujo de placas paralelas. Mientras que el CD44 aislado de líneas celulares hematopoyéticas humanas HL60, K562 y RPMI 8402 no sostuvo ningún rodamiento de células CHO-E, CD44 de KG1a exhibió actividad de ligando para E-selectina en un rango de flujo. Significativamente, se observó mayor rodamiento sobre CD44 de KG1a no tratada, que sobre CD44 KG1a tratada con N-glucosidasa-F, sobre CD44 KG1a tratada con L-fucosidasa, sobre proteína de membrana de KG1a tratada con neuraminidasa de *Vibrio Cholerae* o inmunoprecipitados con Ac isotipo (control) (Figura 5A). Además, comparado con una cantidad equivalente molecular de inmunoprecipitado KG1a PSGL-1, CD44 mostró marcadamente mayor actividad de ligando para E-selectina a 2,8 dinas/cm² ($p < 0,001$) (Figura 5A). Sin embargo a una tensión de corte menor, de 0,6 dinas/cm², el rodamiento de células CHO-E sobre PSGL-1 fue equivalente al de CD44. Estos datos sugieren que PSGL-1 y CD44 tienen contribuciones solapadas para la unión a E-selectina que se superponen a una tensión de corte baja, pero el enlace de CD44 a E-selectina predomina a tensión de corte fisiológica más alta. Hay que hacer notar que células CHO transfectadas con selectina-P rodaron sobre PSGL-1 de KG1a, pero no sobre CD44KG1a, indicando que CD44 no es un ligando para selectina-P (Figura 5B). En todos los experimentos, células CHO control negativas (transfectantes CHO falsos y células CHO-E o CHO-P tratadas con Acsmo anti-E-selectina o anti-P-selectina, respectivamente bloqueantes de función) no entraron en contacto ni rodaron sobre ninguna de las proteínas.

Para determinar si el CD44 expresado de forma natural en HPC funciona como un ligando de E-selectina, investigamos la distribución de reactividad HECA-452 y la actividad de ligando para E-selectina de CD44 expresadas en células inmaduras de médula ósea humana CD34+ y más maduras (CD34-/línea+) (incluyendo poblaciones enriquecidas para monocitos (CD14+), granulocitos (CD15+), y linfocitos (células B (CD19+) y células T (CD3+)). Sorprendentemente, aunque los inmunoprecipitados de KG1a con Hermes-1 en SDS-PAGE revelaban 3 bandas (100, 120 y 190 kDa), solo se inmunoprecipitó una banda simple de 100 kDa con CD44 teñida con HECA-452 de las células CD34+ y que funcionó como ligando para E-selectina (Figura 6A). Se obtuvieron resultados similares si las células CD34 se enriquecían por selección negativa o selección positiva. Se utilizó incluso proteína de membrana de células de línea + 10 veces en exceso para inmunoprecipitación con CD44, y todavía no se obtuvo ni tinción de CD44 con HECA-452 ni actividad de ligando de CD44 para E-selectina (Figura 6A). Además, inmovilizados en plástico; solo los inmunoprecipitados de células CD34+/CD44+ sostuvieron el rodamiento de células CHO-E mientras que el inmunoprecipitado con CD44 de células CD34- no poseía ninguna actividad de ligando para E-selectina.

Para analizar mejor la expresión y estructura del CD44 reactivo a HECA-452 en las células hematopoyéticas humanas, se evaluó la expresión de HCELL en blastos leucémicos nativos. Se detectaron cuatro bandas teñidas con HECA-452 (74, 100, 140 y 190 kDa) en blastos de leucemia mieloide aguda (LMA) (subtipo M5) (Figura 6B). La tinción con HECA-452 se eliminó por completo en la región de 100 kDa después del tratamiento con N-glucosidasa-F, mientras que las bandas de 74 y 140 kDa tenían una tinción persistente y la banda de 100 kDa se tiñó a un peso molecular aparentemente más reducido (Figura 6B). Cuando el inmunoprecipitado de CD44 de proteína de membrana de LMA (M5) se trató con N-glucosidasa-F, la reactividad con HECA-452 así como la actividad de ligando para E-selectina se abolieron completamente. De forma similar al inmunoprecipitado de KG1a con CD44, CD44 de LMA (M5) mostró una isoforma menor a 120 kDa detectada con HECA-452, pero la banda principal y proteína activa biológicamente fue la isoforma de 100 kDa de CD44. También se inmunoprecipitó CD44 de blastos de LMA indiferenciada (M0), una LMA con maduración (M1) y una forma atípica de leucemia mieloide crónica (LMC) (BCR/ABL-). Hay que hacer notar que la expresión de epítomos reactivos a HECA-452 en el inmunoprecipitado de CD44 se correlacionaba directamente con la capacidad de sostener el rodamiento de células CHO-E (Figura 6D). La expresión de CD44 (Acsmo Hermes-1) en estas leucemias fue equivalente (>90 % células positivas teñidas para citometría de flujo), lo que indica además que la capacidad para interactuar con E-selectina dependía de la elaboración de glucosilaciones reactivas para HECA-452. Además, dado que CD44 se expresa también en células

no hematopoyéticas, analizamos CD44 expresado en la línea celular de endotelio de médula ósea humana BMEC-1. Aunque BMEC-1 expresaba niveles de CD44 altos (Figura 6E), el CD44 de estas células no tenía reactividad HECA-452 y no poseía ninguna actividad de ligando para E-selectina (Figura 6D).

5 Ejemplo 5: Valoración de ligandos de glucoproteínas para L-selectina de células hematopoyéticas humanas usando un ensayo de rodamiento con transferencia

Las preparaciones de membranas teñidas con HECA-452 A3D8 o Hermes-1 se volvieron transparentes incubando en H/H/Ca⁺⁺/glicerol al 10 %. Para estudiar las interacciones de adherencia mediadas por la L-selectina, las transferencias se colocaron en cámara de flujo de placas paralelas y los linfocitos se perfundieron en la cámara a una tensión de corte de 2,3 dinas/cm² y las interacciones de adherencia celular se observaron mediante microscopía con vídeo y se analizaron en tiempo real.

Se cuantificó el número de linfocitos rodando sobre y entre las regiones de bandas en 5 campos diferentes bajo un aumento de 200x en un monitor de vídeo, utilizando marcadores de peso molecular como guías para alinear y visualizar las proteínas de interés. Se prepararon controles negativos añadiendo EDTA 5 mM al tampón de ensayo de los linfocitos para quelar el Ca⁺⁺ requerido para la unión, usando linfocitos tratados con PMA (50 ng/ml, el cual induce el desprendimiento de L-selectina (Oxley, S.M. y Sackstein, R. (1994). Blood. 84: 3299-3306), o tratando los linfocitos con AcsMo anti-L-selectina 810 µg/ml) para bloqueo funcional para verificar la intervención exclusiva de L-selectina.

Se perfundieron los Transferencias Western de proteínas de membrana de KG1a teñidos con HECA-452 (Oxley, S.M. & Sackstein, R. (1994). Blood. 84: 3299-3306, Sackstein, R., Fu, L. y Allen, K.L. (1997) Blood. 89: 2773-2781) sobre las membranas para evaluar la actividad de ligando para L-selectina sobre las bandas separadas inmunoteñidas. Se observó contacto y rodamiento de los linfocitos dependiente de flujo (a fuerza de cizalla de 2, 3 dinas/cm²) sobre las bandas teñidas con HECA-452 de 98, 120 y 130 kDa que fue dependiente de L-selectina. Para confirmar que el contacto y rodamiento dependiente de flujo de los linfocitos era dependiente de L-selectina, el experimento también se realizó en presencia de EDTA 5 mM, y pretratando los linfocitos con anticuerpos monoclonales bloqueantes anti-L-selectina o PMA (Figura 7D). No se demostró ninguna actividad de ligando para L-selectina en ninguna de las zonas de la membrana no teñidos con HECA-452 (Figura 7D). La banda de 98 kDa teñida con HECA-452 mostraba la mayor actividad de ligando para L-selectina (tanto como 6 veces más alta comparado con las otras bandas), y esta banda es también la principal proteína portadora de N-glicanos expresada en células KG1a (La figura 7C). Varias de las bandas reactivas a HECA-452 no poseían actividad de ligando para L-selectina, sugiriendo las modificaciones estructurales asociadas a estas proteínas a estas proteínas reactivas a HECA-452 no eran suficientes para la actividad de ligando para L-selectina. La actividad de ligando para L-selectina estaba ausente en los *Transferencias Western* de proteínas de membrana de HL60, K562 y RPMI 8402, a pesar de la evidencia de bandas reactivas a HECA-452. La tinción con HECA-452 no interfirió con la adherencia de linfocitos mediada por L-selectina a proteínas relevantes de KG1a inmovilizadas en ensayos de las transferencias Western de flujo hidrodinámico.

40 Ejemplo 6: Actividad de ligando para L-selectina del CD44 de KG1a CD44 inmunoprecipitado (HCELL)

Las inmunotransferencias de CD44 KG1a en lisado celular total de células KG1a usando el AcMo Hermes-1 mostraron una banda de 98 kDa, así como bandas de 120 y 130 kDa las cuales pueden reflejar las isoformas que previamente se designaban CD44R2 y CD44R1, respectivamente (figura 9) (Dougherty, G.J., Lansdorp, P.M., Cooper, D.L. y Humphries, R.K. (1991). J. Exp. Med. 174:1-5). Una señal débil a 190 kDa que se detectó con Hermes-1 y A3D8, la cual puede reflejar una forma condroitin sulfato de CD44 modificada (Figura 9) (Jalkanen, S.T., Jalkanen, M., Bargatze, R., Tammi, M., y Butcher, E.C. (1988). J. Immunol. 141: 1615-1623). Para analizar si esta glucoforma de CD44 exhibía actividad de ligando para L-selectina, se inmunoprecipitó KG1a CD44 de células KG1a con AcMo Hermes-1 y luego se realizaron ensayos de rodamiento con transferencia sobre inmunotransferencias de CD44 teñidos con Hermes-1 o con HECA-452. Sorprendentemente, el CD44 inmunoprecipitado con Hermes-1 que luego se inmunotizó con Hermes-1 solo mostró las especies de 98 kDa y 190 kDa, pero no las especies de 120 y 130 kDa. Por otro lado, CD44 inmunoprecipitado con Hermes-1 que se inmunotizó con HECA-452 ilustró no solo las especies de 98 kDa, sino también las especies de 120, 130 y 190 kDa (Figura 9). En todos los casos sin embargo, solo la proteína de 98 kDa reactiva a HECA-452, reactiva a Hermes-1 sostuvo interacciones ligando para L-selectina (Figura 9).

60 Ejemplo 7: Dependencia de N-glucosilación para la actividad de ligando de L-selectina y para la inmunodetección mediante HECA-452

Para examinar la dependencia de la actividad de ligando a L-selectina de la N-glucosilación, la inmunoprecipitación de KG1a CD44 con Hermes-1 se realizó también en proteínas de membrana KG1a pretratadas con N-glucosidasa-F. Como se representa en la figura 10A, el tratamiento con N-glucosidasa-F eliminó por completo la tinción con HECA-452 de la especie de 98 kDa y abolió todo el contacto y rodamiento de los linfocitos sobre la transferencia mediado por L-selectina. Se evaluó la actividad de ligando de todos los intervalos de peso molecular en la muestra tratada con N-glucosidasa-F y se observó algún cambio en el peso molecular con la des-N-glucosilación de la glucoproteína.

Después de la des-N-glucosilación no hubo bandas que demostraran la actividad de ligando para L-selectina.

Para analizar adicionalmente la actividad de ligando para L-selectina de CD44, se realizaron ensayos de Stamper-Woodruff usando inmunoprecipitados de células KG1a inmunoprecipitadas con CD44 o con control de isotipo (IgG de rata) que fueron colocados sobre portaobjetos como se ha descrito (Sackstein, R. & Dimitroff, C.J. (2000). Blood. 96, 2765-2774). Sirvieron como controles negativos los experimentos utilizando CD44 tratado con neuraminidasa de *Vibrio cholerae*, linfocitos tratados con AcMo anti-L-selectina (HRL-1 para linfocitos de rata; LAM1-3 para linfocitos humanos), o coincubación con EDTA 5 mM. Inmunoprecipitado, KG1a CD44 mantuvo la adherencia de los linfocitos mediada por L-selectina (362 ± 15 células unidas/campo, contados 5 campos, 3 portaobjetos por experimento, 2 experimentos), mientras que no se observó unión con inmunoprecipitado con control de isotipo o con inmunoprecipitado de KG1a CD44 tratado con neuraminidasa o tratamientos con EDTA/anti-L-selectina (<10 células/campo). HECA-452 no bloqueó la adherencia de los linfocitos a CD44 aislado de KG1a, células intactas KG1a o proteínas de membrana de KG1a, a pesar de concentraciones tan altas como 100 $\mu\text{g/ml}$. Estos resultados corroboraron y confirmaron los datos de los estudios con la cámara de flujo de placas paralelas descritos anteriormente.

Ejemplo 8: KG1a CD44 (HCELL) funciona como un ligando de L-selectina en células hematopoyéticas humanas aisladas recientemente

La actividad de HCELL en las células mononucleares normales de la médula ósea se examinó mediante ensayos de Stamper-Woodruff de poblaciones separadas de células CD34+/CD44+, CD34+/CD44-, CD34-/CD44+ y CD34-/CD44-. La actividad HCELL estaba ausente en todos los subtipos CD44-, pero estaba presente en más del 80 % de células CD34+/CD44+ y solo ~1 % de células CD34-/CD44+. Dado que los estudios bioquímicos de CD44 en células de médula ósea CD34+ humanas normales estaban limitados por las dificultades para adquirir cantidades suficientes de células para dichos análisis, se examinó la actividad HCELL de CD44 aislada de blastos en los que se conocía la expresión de HCELL (Sackstein, R. & Dimitroff, C.J. (2000). Blood. 96, 2765-2774). Se analizaron blastos de 11 leucemias: nueve mieloides (dos indiferenciadas (M0), dos sin maduración (M1), una con maduración (M2), dos mielomonocíticas (M4) y dos monocíticas (M5)), una linfocítica aguda (pre-B) y una bifenotípica. Con excepción de una M0, todos los blastos mostraron actividad HCELL. Se analizó la actividad de ligando para L-selectina de CD44 aislado de blastos de cinco de las leucemias descritas arriba: una M0 con carencia de actividad HCELL y las otras con actividad HCELL (la leucemia bifenotípica, la otra M0, una M4, y una M5). En pruebas de rodamiento de transferencia de proteína de membrana total, se observó contacto y rodamiento de linfocitos sobre la banda de 98 kDa en todas las leucemias que expresaban HCELL, pero no se observó rodamiento sobre ninguna proteína de membrana en la M0 con ausencia de actividad HCELL. Se inmunoprecipitó CD44 de cada una de estas células, y, similar a CD44 de KG1a, la isoforma predominante fue una especie de 98 kDa. Un ejemplo representativo de estos datos, de una leucemia M4, se muestra en la Figura 10B. Se verificó el requerimiento de estructuras N-glucosiladas en CD44 para la reactividad HECA-452 y la actividad de ligando para L-selectina mediante pretratamiento de las proteínas de membrana de las leucemias con N-glucosidasa-F (figura 10B). A la inversa, aunque los blastos M0 HCELL (-) poseían CD44 equivalente a aquellos especímenes de leucemia HCELL (+) (como se determinó por citometría de flujo y por transferencia Western usando el Ac Hermes-1), el CD44 de estas células no fue reactivo con HECA-452 y no exhibía actividad de ligando para L-selectina. En conclusión, estas observaciones indicaban que la glucoforma de CD44 que exhibe actividad HCELL no era una característica exclusiva de la línea celular KG1a, sino que representaba una modificación fisiológica de CD44 presente en blastos de algunos subtipos de leucemias. Estas observaciones añadieron más evidencia al componente de N-glicanos expresados en CD44.

Ejemplo 9: La actividad del ligando de L-selectina de KG1a CD44 es independiente de sulfatación.

Para determinar si CD44 está sulfatado en las células KG1a, se marcaron células en cultivo KG1a metabólicamente con [^{35}S]-SO₄. El inmunoprecipitado CD44 de estas células estaba de hecho sulfatado (Figura 11A). Para probar si la sulfatación era crítica para la actividad de ligando para L-selectina de CD44, se pretrataron células KG1a con bromelina al 0,1 %, una proteasa que elimina toda la actividad HCELL de KG1a (Sackstein, R. & Dimitroff, C.J. (2000). Blood. 96, 2765-2774) y también elimina CD44 de la superficie celular (Hale, L.P. y Haynes, B.F. (1992). J. Immunol 149: 3809-3816). Después de la digestión con bromelina, la reexpresión de HCELL requiere síntesis proteica de novo, y la proteína sintetizada en presencia de clorato (un inhibidor metabólico de proteína y de sulfatación de carbohidratos) no está sulfatada (Sackstein, R., Fu, L. y Allen, K.L. (1997). Blood. 89: 2773-2781). Por lo tanto, se trató KG1a con bromelina y se confirmó la eliminación de CD44 por citometría de flujo. Las células KG1a se cultivaron en ausencia o presencia de clorato sódico 10 mM durante 24 horas y las células se radiomarcaron metabólicamente durante las últimas 8 horas de incubación con [^{35}S]-SO₄ en medio CRIM-30 deficiente en sulfato. Como se ilustra en Figura 11A, la incorporación de [^{35}S]-SO₄ en el inmunoprecipitado CD44 (Hermes-1) se inhibió completamente en las células tratadas con clorato. Este efecto del clorato fue específico para la incorporación de sulfato y no una inhibición general de la síntesis de la proteína CD44, ya que el radiomarcado metabólico [^{35}S]-metionina/cisteína de CD44 fue idéntico en las poblaciones celulares tratadas y no tratadas con clorato.

Se realizaron después ensayos de rodamiento de transferencia sobre CD44 inmunoprecipitado de células control y tratadas con clorato. Se comprobó la actividad de ligando para L-selectina de CD44 sulfatado y no sulfatado (figura 11B). Estos datos experimentales confirmaron los resultados de nuestros estudios previos que demuestran la

independencia de sulfatación de la actividad de HCELL (Sackstein, R., Fu, L., y Allen, K.L. (1997). Blood. 89: 2773-2781). Sorprendentemente, no se evitó el reconocimiento de CD44 libre de sulfato por HECA-452 (Figura 11B). Estos datos muestran que la sulfatación no era una característica crítica para que el epítipo CD44 de KG1a sea reconocido por el anticuerpo monoclonal HECA-452.

Ejemplo 10: Actividades diferenciales de unión a L-selectina de ligandos de L-selectina de células hematopoyéticas humanas, HCELL y PSGL-1.

A. Métodos generales

Células, Anticuerpos y Enzimas

Las líneas celulares hematopoyéticas humanas KG1a (leucémica mieloide, HCELL+/PSGL-1+), HL60 (leucemia promielocítica, HCELL-/PSGL-1+, RPMI 8402 (leucemia linfocítica, HCELL-/PSGL-1+) y K562 (leucemia eritrocítica, HCELL-/PSGL-1-), y blastos circulantes de una leucemia mieloide aguda (LMA) sin maduración (M1) *de novo* (HCELL+/PSGL-1+) se mantuvieron en RPMI-1640/FBS al 10 %/Penicilina-Estreptomicina 1 % (Life Technologies, Inc). Las células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con ADNc de longitud completa que codifica selectina-P (CHO-P; clon E4I) y CHO-vector vacío (CHO-simuladas) se obtuvieron de Robert C. Fuhlbrigge (Harvard Medical School), y se mantuvieron en MEM/FBS al 10 %/penicilina-estreptomicina al 1 % (Life Technologies, Inc.) y HAM's F-12/Glutamina 5 mM/FCS al 10 %/penicilina-estreptomicina al 1 %. Se prepararon linfocitos humanos (PBMc) a partir de sangre total como se ha descrito previamente (Oxley, S.M. y Sackstein, R. (1994) Blood 84 (10), 3299-3306). Linfocitos de conducto torácico de rata (TDL) que expresan niveles altos de L-selectina, que funciona de forma idéntica a la L-selectina de linfocito humano, se obtuvieron por canulación del conducto torácico de la rata como se ha descrito previamente (Oxley, S.M. y Sackstein, R. (1994) Blood 84 (10), 3299-3306). Se prepararon neutrófilos humanos de sangre periférica total, recolectados en tampón citrato ácido/dextrano al 0,6 % y se dejaron separar los hematíes por gravedad durante 30 minutos a Temperatura ambiente. El plasma rico en leucocitos se diluyó 1:1 en PBS sin Ca++/Mg++ y los granulocitos se separaron mediante centrifugación por gradiente con Ficoll-Hypaque (1,077-1,0800 g/ml). Para destruir los hematíes residuales en los sedimentos celulares, las células fueron expuestas a una solución hipotónica durante 30 segundos y después neutralizado con NaCl hipertónico. Este procedimiento dio como resultado un enriquecimiento de granulocitos >98 %. Los blastos leucémicos de un paciente con una leucemia mieloide aguda sin maduración (M1) se aislaron de la sangre periférica mediante centrifugación por gradiente con Ficoll-Hypaque (1,077-1,0800 g/ml).

El anticuerpo monoclonal anti-PSGL-1 PL-1 y PL-2, y los anticuerpos anti-CD45-FITC y anti-CD34 QBEND se adquirieron en Coulter-Immunotech, Marsella, Francia. El anticuerpo monoclonal anti-PSGL-1 PSL-275 fue un regalo del Dr. Ray Camphausen (Genetics Institute, Cambridge, MA). Los anticuerpos anticuerpo monoclonal anti-sialil Lewis X (CSLEX-1), anti-CD44 (clon L178) y anti CD43 se compraron de Beckton Dickinson, San Jose, CA. El anticuerpo monoclonal anti-CD Hermes-1 (IgG2a de rata) fue caracterizado originalmente por Jalkanen *et al.* (Jalkanen, S.T., Bargatze, R.F., Herron, L.R. y Butcher, E.C. (1986) Eur. J. Immunol. 16, 1195-1202). Anticuerpo monoclonal de rata anti-CLA humano (HECA-452), anti-selectina-L de rata (HRL-1; anticuerpo bloqueante de unión), anti-selectina-P humana (clon AK-4) y anti-selectina L humana (LAM1-3) se compraron a Pharmingen, San Diego, CA. Todos los anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos y los controles de isotipo se obtuvieron de Zymed, San Francisco, CA.

OSGE se compró de Accurate Chemicals, Westbur y, NY y la neuraminidasa de *Vibrio cholerae* y la N-glucosidasa-F se obtuvieron de Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN. La metaloproteasa de veneno de cobra, mocarhagin (Spertini, O., Cordey, A.S., Monai, N., Giuffre, L. y Schapira, M. (1996) *J. Cell Biol.* 135 (2), 523-531; De Luca, M., Dunlop, L.C., Andrews, R.K., Flanner y, J.V., Ettling, R., Cumming, D.A., Veldman, G.M. y Berna, M.C. (1995) *J. Biol. Chem.* 270 (45), 26734-26737), fue un regalo del Dr. Ray Camphausen (Genetics Institute, Cambridge, MA). El inhibidor metabólico, tunicamicina, y otros compuestos químicos se adquirieron en Sigma, Inc. (St. Louis, MO).

Análisis por citometría de flujo

Se realizó un análisis por citometría de flujo en las CH humanas utilizando métodos de tinción por inmunofluorescencia directa e indirecta. Todas las células utilizadas para estos experimentos se lavaron dos veces con PBS/FBS al 2 %, se suspendieron a 10⁷/ml de PBS/FBS al 1 %. Los anticuerpos primarios, anti-CLA, -CD15s, -CD34, -CD43, -CD44, -CD62L, -PSGL-1 (PSL-275, y PL-1) junto con los controles de isotipo apropiados se incubaron en hielo con las células durante 30 minutos. Después de 2 lavados con PBS/FBS al 2 %, las células se resuspendieron en PBS/FBS al 1 % y se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromo (2 µl) durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces con PBS/FBS al 2 %, se resuspendieron en PBS y se llevó a cabo la citometría de flujo en un aparato FACScan equipado con láser de argón sintonizado a 488 nm (Becton Dickinson)).

Radiomarcaje de proteínas de membrana de células hematopoyéticas humanas, SDS-PAGE y transferencia Western

Los cultivos celulares ($1-2 \times 10^6$ células/ml) se incubaron con [^{35}S]-EasyTagTM- L-Metionina (150 $\mu\text{Ci/ml}$) (NENTM, Boston, MA) en medio RPMI-1640 sin metionina durante 8 horas antes de la preparación de las proteínas de membrana. Las proteínas de membrana se prepararon como se ha descrito previamente.

Para el SDS-PAGE y la transferencia Western, las preparaciones de membrana o inmunoprecipitados se diluyeron en tampón de muestra reductor y se separaron en geles SDS-PAGE al 7 %. Para la autorradiografía, los geles para separar los inmunoprecipitados marcados con [^{35}S] se secaron y fueron expuestos a una película Kodak BioMax MR (Fisher Scientific) durante 3 horas. Para la transferencia Western, las proteínas de membrana separadas se transfirieron a una membrana PVDF Sequi-blotTM (Bio-Rad, Inc., Hercules, CA) y bloqueadas con PBS/Tween-20 al 0,1 %/FBS al 60 % durante 2 horas a 4 °C. Las membranas se incubaron con IgM de rata anti-CLA humano HECA-452 (1,2 $\mu\text{g/ml}$), IgG de rata anti-CD44 humano Hermes-1 (1 $\mu\text{g/ml}$) o anticuerpo anti-PSGL-1 humano PL-2 (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 hora a Temperatura ambiente. En paralelo se realizaron inmunotransferencias con control de isotipo usando IgM de rata, IgG de rata o IgG de ratón para evaluar las proteínas reactivas no-específicas. Después de tres lavados con PBS/Tween-20 0, 1 %, las membranas se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios, anticuerpos conjugados con PA de conejo anti-IgM de rata (1:400), de cabra anti-IgG de rata o de cabra anti-IgG de ratón (1:8000) (Zyned Labs. Inc., San Francisco, CA). Se añadió sustrato PA, Western Blue® (Promega, Madison, WI) para revelar las transferencias.

Análisis en cámara de flujo de placas paralelas hidrodinámica

Interacciones de adhesión mediadas por L-selectina

Usando la cámara de flujo de placas paralelas en condiciones de tensión de corte definidas, se estudiaron las interacciones de adhesión mediadas por L-selectina entre células hematopoyéticas humanas y la L-selectina expresada en los leucocitos de forma natural (Lawrence, M.B., McIntire, L.V., y Eskin, S.G. (1987) Blood 70 (5), 1284-1290). La adherencia y rodamiento de los leucocitos sobre las monocapas de células hematopoyéticas humanas se visualizó en tiempo real en un microscopio con video usando la cámara de flujo de placas paralelas preparada de la siguiente forma. Antes de realizar los experimentos, se lavaron los leucocitos dos veces con HBSS y suspendidos a $10^7/\text{ml}$ en HBSS/HEPES 10 mM/CaCl₂ 2 mM (H/H/Ca⁺⁺). Se prepararon grupos control negativos tratando las células con PMA (50 ng/ml H/H/Ca⁺⁺ durante 1 hora a 37 °C) para inducir la separación de L-selectina de la superficie celular, pretratando con AcMo HRL-1 (10 $\mu\text{g/ml}$) para bloquear la unión de L-selectina, o incubando con EDTA 5 mM para quelar el Ca⁺⁺ requerido para la unión de L-selectina. Para preparar las monocapas de células hematopoyéticas humanas (confluentes 100 %), se sembraron suspensiones de células hematopoyéticas humanas (KG1a, HL60, RPMI 8402, K562) a $2 \times 10^6/\text{ml}$ en RPMI-1640 sin bicarbonato Na⁺/FBS2 % en placas de 6 pocillos a $5 \times 10^6/\text{pocillo}$, centrifugados para formar una capa con las células y luego fijarlas con glutaraldehído al 3 %. Los grupos aldehído reactivos se bloquearon con lisina 0, 2M y las células en el plato se suspendieron en H/H/Ca⁺⁺. Para asegurar la dependencia de la unión de restos de de ácido siálico a la L-selectina, se pretrataron las células con neuraminidasa de *Vibrio cholerae* (0,1 U/ml H/H/Ca⁺⁺ durante 1 hora a 37 °C). Para examinar la influencia de las sialomucinas (incluyendo PSGL-1) y PSGL-1 sola, se realizaron tratamientos con OSGE (60 $\mu\text{g/ml}$ H/H/Ca⁺⁺ durante 1 hora a 37 °C) o mocarhagina (10 $\mu\text{g/ml}$ durante 20 minutos a 37 °C), respectivamente. Además, dado que HCELL se expresa en células KG1a y las N-glucosilaciones con ácido siálico sobre HCELL son críticas para la actividad de ligando a L-selectina (Sackstein, R. y Dimitroff, C.J. (2000) Blood 96, 2765-3774) la contribución de HCELL en las células KG1a se distinguió en primer lugar, separando todos los restos de ácido siálico de la superficie de la célula con neuraminidasa de *Vibrio cholerae* (0, 1 U/ml durante 1 hora a 37 °C) y posteriormente incubando las células con un inhibidor metabólico de la N-glucosilación, tunicamicina (15 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %), para evitar la síntesis de N-glicanos *de novo* (es decir, epítopos HECA-452 en CD44/HCELL). El pretratamiento con neuraminidasa eliminó de la superficie de la célula toda la actividad HCELL residual, y por lo tanto, este tratamiento permitió la evaluación de HCELL sintetizado nuevamente en la superficie celular. Se prepararon muestras de células hematopoyéticas mediante citocentrifugación en placas de múltiples pocillos como se ha descrito arriba. La cámara de flujo de placas paralelas se colocó encima de las monocapas de células y los leucocitos se perfundieron en el interior de la cámara. Después de dejar contactar los leucocitos con las monocapas de células a una tensión de corte de 0,5 dinas/cm² (a la cual no establecen fenómenos de adhesión) ajustamos la tasa de flujo de acuerdo para ejercer una tensión de corte de 1 a >30 dinas/cm². Se cuantificó el número de leucocitos rodando en un marco de cinco campos independientes bajo un aumento de 200X a una tensión de corte de 0, 2, 0,4, 0,8, 2,2, 4,4, 8,8, 17,6 y 26,4 dinas/cm². Se realizaron un mínimo de 3 experimentos utilizando todo el intervalo de tensiones de corte y los resultados se expresaron en forma de media $\pm$ desviación estándar.

Interacciones de adhesión mediadas por P-selectina

En estos experimentos, se prepararon monocapas de CH fijadas con glutaraldehído en placas de 6 pocillos como se ha descrito anteriormente, y, cuando estaba indicado, las células se pretrataron con mocarhagina (10 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 minutos, y se lavaron abundantemente con RPMI 1640 sin bicarbonato Na⁺/FBS al 2 % antes de ser fijadas. Para estudiar las interacciones de adhesión a selectina-P, se utilizaron células CHO que expresaban selectina-P en su longitud completa de forma estable (CHO-P) o vector vacío (CHO-simuladas) extraídas de frascos con EDTA 5 mM, se lavaron abundantemente y se resuspendieron a $2 \times 10^6/\text{ml}$ para su utilización en la cámara de flujo de placas

paralelas. La expresión de selectina-P en las células CHO-P se confirmó por análisis de citometría de flujo. Suspensiones de células conteniendo EDTA 5 mM o AcsMo anti-selectina-P (10 µg/ml durante 30 minutos en hielo) se utilizaron como controles negativos para confirmar la unión dependiente de calcio. Las células se perfundieron en el interior de la cámara y se las dejó caer sobre las monocapas de células antes de iniciar la evaluación de la adhesión de selectina-P a 0,2, 0,4, 0,8, y 2,2 dinas/cm². El contacto y rodamiento celular se visualizó a un aumento de 100X y se cuantificó y analizó como se ha descrito anteriormente.

Ensayo de Stamper-Woodruff

10 Adherencia de los linfocitos a HCELL y a PSGL-1 mediada por L-selectina

Equivalentes molares de HCELL o PSGL-1 purificados por inmutafinidad (0,75 µg de HCELL reducido (100 kDa) y 1 µg de PSGL-1 completamente reducida (140 kDa) se transfirieron a portaobjetos y se dejaron secar. Estas manchas de proteínas se fijaron con glutaraldehído al 3 %, los grupos glutaraldehído no reactivos se bloquearon con lisina 0,2M y se colocaron las preparaciones en RPMI-1640 sin Bicarbonato Na⁺ hasta que estuvieran listas para las pruebas. Los linfocitos (10⁷/ml de RPMI-1640 sin bicarbonato Na⁺/FBS al 5 %) se colocaron cubriendo estos inmunoprecipitados fijados y se incubaron en un agitador orbital a 80 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El número de linfocitos adherentes se cuantificó mediante un microscopio óptico usando un ocular con cuadrícula bajo un aumento de 100X (un mínimo de 5 campos/preparación, 2 preparaciones/experimento, y 3 experimentos separados). Los datos se presentaron como la media de los linfocitos unidos ± desviación estándar. Inmunoprecipitados control de KG1a CD34 y L-selectina se evaluaron también de esta forma. Para verificar la dependencia del ácido siálico se pretrataron las muestras con neuraminidasa de *Vibrio cholerae* (0, 1 U/ml RPMI 1640 sin Bicarbonato Na⁺/FBS 2 % durante 1 hora a 37 °C). Además, para verificar que la adhesión celular era dependiente de L-selectina, todos los ensayos incluyeron controles negativos, en los que los linfocitos se trataron con PMA (50 ng/ml durante 30 minutos a 37 °C) o anticuerpos bloqueantes funcionales (AcMo anti-L-selectina de rata HRL-1 o AcMo anti L-selectina humana LAM1-3; 10 µg/ml) o suspensiones de linfocitos con EDTA 5 mM.

Adherencia de los linfocitos a CH humanas mediada por L-selectina

Para el análisis de la actividad celular de ligando para L-selectina de las CH humanas, se prepararon por citocentrifugación células KG1a, HL60, RPMI-8402 y K562, y blastos de leucemia *de novo*, se fijaron con glutaraldehído al 3 %, se bloquearon con lisina 0,2M y se cubrieron con linfocitos (10⁷/ml de RPMI-1640 sin bicarbonato Na⁺/FBS al 5 %) sobre un agitador orbital a 80 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Las preparaciones se lavaron cuidadosamente con PBS y los linfocitos unidos se fijaron con glutaraldehído al 3 %. Todos los ensayos incluyeron controles negativos como se ha descrito anteriormente. Los datos se presentaron como la media ± SD del número de linfocitos unidos evaluados a un aumento de 100X por un mínimo de 5 campos/laminilla en laminillas duplicadas de 3 experimentos separados.

B. HCELL es capaz de unirse a L-selectina en un amplio intervalo de tensión de corte

El objetivo de este estudio fue valorar la capacidad de HCELL y PSGL-1 de las CH humanas para sostener la actividad de unión a L-selectina dependiente de corte en un intervalo de tensiones de corte. Se analizaron las características de unión a L-selectina de cada una de estas moléculas realizando sistemas de prueba de adherencia basada en el flujo de cizalla usando células hematopoyéticas humanas que expresen HCELL y/o PSGL-1: KG1a (HCELL+/PSGL-1+), HL60 (HCELL-/PSGL-1+), RPMI 8402 (HCELL-/PSGL-1+), K562 (HCELL-/PSGL-1-) y una leucemia mieloide aguda (LMA) sin maduración (M1) *de novo* (HCELL+/PSGL-1+) (tabla 2) (Oxley, S.M. y Sackstein, R. (1994) *Blood* 84 (10), 3299-330; Sackstein, R., Fu, L. y Allen, K.L. (1997) *Blood* 89 (8), 2773-2781; Sackstein, R. y Dimitroff, C.J. (2000) *Blood* 96, 2765-2774.)

50 **Tabla 2 Análisis mediante citometría de flujo de los sialoglicoconjugados en líneas celulares hematopoyéticas**

Líneas celulares hematopoyéticas ¹	% de tinción de células positivas*							
	CD15s	CD34	CD43	CD44	CD45	PSGL-1	CLA	CD62L
KG1a (Mieloide)	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
K562 (Eritroide)	—	—	++++	+	—	—	—	—
RPM 8402 (Linfoide)	—	++++	++++	++++	++++	+++	—	++++
HL-60 (Promieloide)	+++	—	++++	++++	++++	++++	++++	—

¹Todas las líneas celulares se mantuvieron en RPM 1640-1610 % FBS / 1 % de penicilina-estreptomycin y se cultivaron a confluencia (1–2 x 10⁶/ml). Las células se aislaron, se lavaron en PBS / 2 % de FBS, se suspendieron en 10⁷/ml PBS/1 % de FBS y se tiñeron / analizaron como se describe en Materiales y Métodos. *El porcentaje de tinción de células positivo indica el número de células que se tiñen más que la tinción de células de control negativo

(grupos de autofluorescencia de Ac solos secundarios conjugados con FITC). Los porcentajes están representados de la siguiente manera - = 0-19 %, + = 20-39, ++ = 40-59 %, +++ = 60-79 % y ++++ = 80-100 %.

Usando la cámara de flujo de placas paralelas bajo presión de flujo hidrodinámica, se observó adherencia y rodamiento de leucocitos sobre monocapas de células hematopoyéticas humanas fijadas con glutaraldehído. Todos los experimentos incluyeron controles negativos par verificar la contribución exclusiva de L-selectina en la mediación de la adherencia célula-célula. Se requirió un umbral de tensión de corte de $\sim 0,5$ dinas/cm² en este sistema para establecer interacciones de adhesión mediadas por L-selectina como se había demostrado previamente (Lawrence, M.B., Kansas, G.S., Kunkel, E.J. y Ley, K. (1997) *J Cell Biol.* 136 (3),717-727; Finger, E.B., Puri, K.D., Alon, R., Lawrence, M.B., von Adrian, U.H. y Springer, T.A. (1996) *Nature* 379 (6562): 266-269) (Figura 12A). Después de alcanzar este nivel de tensión de corte, la adherencia y rodamiento de los leucocitos se enumeró en un amplio intervalo de tensiones de corte. Se observó rodamiento de linfocitos humanos dependiente de L-selectina y de TDL de rata sobre células HL60 en un rango de tensión de corte de 0,4 dinas/cm² hasta un máximo de 10 dinas/cm² (Figura 12A). Sin embargo, no hubo evidencia de rodamiento sobre células K562, y, a pesar de la expresión de PSGL-1, las células RPMI 8402 tampoco mostraron actividad de ligando para L-selectina (Figura 12A y Tabla 2). En contraste, se observó rodamiento de linfocitos mediado por L-selectina y de TDL de rata sobre monocapas de células KG1a a tensiones de corte en exceso de 26 dinas/cm², mientras, sobre células HL60, el rodamiento de linfocitos humanos/TDL estuvo ausente a partir de 17 dinas/cm² (figura 12A). Además, la frecuencia de linfocitos rodando sobre células KG1a fue 5 veces mayor a lo largo de todo el amplio rango de tensión de corte que el rodamiento sostenido mediado por L-selectina sobre las células HL60 (figura 12A). La disparidad entre la alta actividad de ligando para L-selectina en las células KG1a y la baja actividad en las células HL60 también se observó utilizando neutrófilos humanos, los cuales expresan niveles equivalentes de L-selectina por análisis de citometría de flujo: las células KG1a sostuvieron 4 veces más rodamiento de neutrófilos mediado por L-selectina que las células HL60 (figura 12B). Estos datos muestran que las células KG1a poseen una capacidad mayor de sostener adherencia de leucocitos mediada por L-selectina sobre un amplio rango de presión de flujo y que la L-selectina expresada nativamente en los linfocitos y en los neutrófilos exhibe una actividad de unión a HCELL o a PSGL-1, expresadas en células hematopoyéticas humanas, comparables.

Para diferenciar la contribución de la actividad de PSGL-1 de la actividad de HCELL en las células KG1a, se realizó la digestión de las células con OSGE o mocarhagina, o se incubaron las células con un Ac bloqueante funcional PL-1, que ambos hacen que PSGL-1 sea incapaz de unirse a L-selectina (Spertini, O., Cordey, A.S., Monai, N., Giuffre, L. and Schapira, M. (1996) *J. Cell Biol.* 135 (2),523-531; Guyer, D.A., Moore, K.L. Lyman, E.B., Schammel, C.M.G., Rogelj, S., McEver, R.P. y Sklar, L.A. (1996) *Blood* 88, 2415-2421; Tu, L., Chen, A., Delahunty, M.D., Moore, K.L., Watson, S.R., McEver, R.P. y Tender, T.F. (1996) *J. Immunol.* 157, 2995-4004; De Luca, M., Dunlop, L.C., Andrews, R.K., Flanner y J.V., Ettling, R., Cumming, D.A., Veldman, G.M. y Berndt, M.C. (1995) *J. Biol. Chem.* 270 (45),26734-2637 14-16). Como alternativa, para diferenciar la contribución de la actividad de HCELL sobre las células KG1a (la cual se expresa exclusivamente en N-glicanos modificados con ácido siálico), se pretrataron células KG1a y blastos de una leucemia *de novo* con neuraminidasa y luego se incubaron con tunicamicina. Concordantemente, la actividad de ligando para L-selectina de las células KG1a fue resistente a la digestión enzimática con OSGE o mocarhagina, y a los tratamientos con anticuerpo PL-1 (Tabla 3). Sin embargo, la actividad de ligando a L-selectina de KG1a se eliminó siguiendo la digestión enzimática con neuraminidasa, la reexpresión de la actividad de ligando estuvo reducida marcadamente después del tratamiento con tunicamicina, mientras que las células tratadas solo con DMSO (control) regresaron a valores basales ($p < 0,001$) (tabla 3). Estos datos muestran que HCELL dependiente de N-glicanos es el mediador primario de la unión a L-selectina en células KG1a. En contraste, la actividad de ligando para L-selectina de las células HL60 fue eliminada completamente mediante digestión con OSGE ($p < 0,001$) (Tabla 3), e inhibida significativamente después de la digestión con mocarhagina ($p < 0,001$) y mediante el tratamiento con anticuerpo bloqueante de función anti-PSGL-1 PL-1 ($p < 0,002$) (Tabla 3). La efectividad de los tratamientos con OSGE y mocarhagin se confirmó por análisis de citometría de flujo de los epitopos sensibles en CD34 y PSGL-1 con AcMo QBEND-10 y AcMo PSL-275, respectivamente. De forma interesante, el hecho de que la actividad de ligando para L-selectina en las células HL60 se eliminara por completo después de la digestión con OSGE, pero no por los tratamientos con AcMo PL-1 o con mocarhagina, sugiere que las células HL60 expresan otros ligandos O-sialoglucoproteína para L-selectina diferentes a PSGL-1. Estos datos concuerdan con estudios previos que demuestran la expresión del o los ligandos para L-selectina diferentes a PSGL-1, sensibles a OSGE, en células HL60 (Ramos, C., Smith, M.J., Snapp, K.R., Kansas, G.S., Stickney, G.W., Ley, K. y Lawrence, M.B. (1998) *Blood* (91),1067-1075).

Tabla 3: Actividad de ligando de la L-selectina de células KG1a y HL60 después de tratamientos enzimáticos o de bloqueo con anticuerpos bajo flujo de cizalladura hidrodinámico¹

Células y tratamientos	% Unión media control a linfocitos ²
KG1a Células + mocarhagina ⁴	110,0 $\pm$ 10,5
+ OSGE (60 μ g/ml) ⁵	104,2 $\pm$ 17,1
+ PL-1 (anti-PSGL-1; 10 μ g/ml)	104,8 $\pm$ 18,0
+ neuraminidasa (Neur.) (0,1 U/ml)	0,3 $\pm$ 0,8*

Células y tratamientos	% Unión media control a linfocitos ²
+ Neur. + DMSO	103,3 ± 12,3
+ Neur. + Tunicamicina (15 µg/ml)	34,3 ± 9,8*
Células HL60 + mocarhagina	50,0 ± 2,0*
+ OSGE	12,5 ± 0,2*
+ PL-1	62,5 ± 1,0**
Controles negativos ³	< 0,5 ± 0,3*

¹Usando la cámara de flujo de placas paralelas, se perfundieron linfocitos de los conductos torácicos (10 ml / ml H / H con Ca⁺⁺) sobre monocapas fijados con glutaraldehído de las células tratadas con mocarhagina (10 µg / ml; 1 hora a 37 °C), OSGE (60 µg / ml; 1 hora a 37 °C), PL-1 (10 µg / ml; 30 minutos en hielo.) a una tensión de corte definida de 4. 4 dinas / cm².

²Unión media de los linfocitos de 5 campos de visión de muestras por triplicado y un mínimo de 3 experimentos se dividió por la unión media de los linfocitos de las células control no tratadas para cada grupo de tratamiento respectivo.

³Los grupos de control negativo consistieron en EDTA 5 mM que contiene medio de ensayo y linfocitos de rata tratados con el anticuerpo anti-L-selectina (HRL-1; 10 µg / ml).

⁴La digestión con mocarhagina se verificó por la incapacidad de del anticuerpo monoclonal anti-PSGL-1 PSL-275 para reconocer el determinante de la unión a la P- y L-selectina o epítipo sensible a mocarhagina sobre PSGL-1 por citometría de flujo.

⁵La actividad OSGE se confirmó por la incapacidad de anti-CD34 QBEND-10 para reconocer su epítipo sensible en OSGE sobre CD34 mediante citometría de flujo.

*Diferencia estadísticamente significativa en la unión de los linfocitos en comparación con las células control no tratadas; prueba t de Student pareada, p <0,001.

**Diferencia estadísticamente significativa en la unión de los linfocitos en comparación con las células control no tratadas; prueba t de Student pareada, p <0,002.

Para investigar adicionalmente actividades de ligando para L-selectina de HCELL y PSGL-1 expresadas en células hematopoyéticas humanas, se realizaron ensayos de Stamper-Woodruff de la adherencia linfocitaria mediada por L-selectina a monocapas de células hematopoyéticas fijadas con glutaraldehído. Las células KG1a poseían actividad de ligando a HCELL desde >40-120 rpm, la cual fue máxima a 80 rpm, mientras que las células HL60 exhibieron actividad de ligando a L-selectina predominantemente a 80 rpm (Figura 12C). Además, la adherencia linfocitaria a células KG1a mediada por L-selectina fue 10 veces más alta que la de las células HL60 a 80 rpm, y no hubo evidencia de unión de linfocitos a las células K562 y RPMI-8402 (Figura 12 C). Dado que el ligando primario para L-selectina en las células HL-60 es PSGL-1 y su expresión es equivalente en células KG1a y HL60, estos datos sugieren además que, basándose en una célula, la actividad HCELL en KG1a posee una capacidad más alta para funcionar como ligando sobre un rango más amplio de tensión de corte.

Aunque el nivel de expresión de PSGL-1 es equivalente entre células KG1a y HL60, se examinó si PSGL-1 en las células KG1a era funcionalmente equivalente a PSGL-1 en las células HL-60. Dado que el determinante de unión N-terminal crítico de PSGL-1 para selectina-P se solapa con el determinante (s) de unión estructural para L-selectina (Snapp, K.R., Ding, H., Atkins, K., Warnke, R., Luscinskas, F.W y Kansas, G.S. (1998) Blood 91, 154-164; De Luca, M., Dunlop, L.C., Andrews, R.K., Flanner y, J.V., Ettling, R., Cumming, D.A., Veldman, G.M. and Berndt, M.C. (1995) J. Biol. Chem. 270 (45), 26734-26737), se razonó que las capacidades de KG1a y de HL60 para unirse a selectina-P se correlacionan con la eficacia de unión de PSGL-1 a L-selectina. Así, se realizaron experimentos en la cámara de flujo de la actividad de ligando a selectina-P utilizando células de ovario de hámster chino transfectadas con ADNc que codifica selectina-P humana de longitud completa (CHO-P). Tanto las células HL60 como las KG1a sostuvieron un rodamiento equivalente de CHO-P mediado por PSGL-1, las células K562 y RPMI-8402 no poseían ninguna actividad (Figura 13A). La actividad de ligando a selectina-P de las células KG1a y HL60 se eliminó mediante tratamiento con mocarhagin (Figura 13B). Distinto a la diferente a la capacidad de sostener actividad de ligando para L-selectina entre las células KG1a y las HL60, estos datos sugieren que la PSGL-1 nativa como se expresa en la membrana celular era similar estructural y funcionalmente en estas líneas celulares. Debe hacerse notar que PSGL-1 de RPMI-8402 no fue funcional como ligando para L-selectina ni para selectina-P, lo que concuerda con el hallazgo de que PSGL-1 en ciertas células linfoides no es funcional debido a la falta de actividad de α 1, 3 fucosiltransferasas y del núcleo 2 β 1, 6 N-acetilglucosaminiltransferasas requeridas para la creación de un ligando bioactivo (Vachino, G., Chang, X. J., Veldman, G.M., Kumar, R., Sako, D., Fouser, L.A., Berndt, M.C. y Cumming, D.A. (1995) J. Biol. Chem. 270 (37), 21966-21974).

C. HCELL es el ligando preferido para L-selectina sobre las CH Humanas

La diferencia en la actividad de ligando para L-selectina entre HCELL y PSGL-1 en células enteras puede reflejar diferencias en la densidad de superficie y/o topografía de la expresión de estas moléculas. Para comparar las

capacidades de unión de HCELL y PSGL-1, se realizaron ensayos convencionales de Stamper-Woodruff basadas en flujo de cizalla de la adherencia linfocitaria a equivalentes molares de HCELL o PSGL-1 purificadas por inmutafinidad de células KG1a y HL60, y de LMA (M1) *de novo*.

5 Para aislar HCELL y PSGL-1 para experimentos de unión celular, se purificaron por inmutafinidad KG1a CD44 (Hermes-1 IgG de rata) y PSGL-1 (PL-2 IgG de ratón) a partir de preparaciones de proteínas de membrana. Las autorradiografías de los inmunoprecipitados de Hermes-1 y PL-2 obtenidos de lisados celulares totales de células KG1a metabólicamente radiomarcadas con [³⁵S] mostraron la especificidad de Hermes-1 y PL-2 para sus respectivos antígenos (Figura 14A), revelando que la forma de CD44 de 100 kDa fue la principalmente aislada y que
10 fueron aislados ambas isoformas de PSGL-1, el dímero (~220 kDa) y el monómero (~140 kDa) (Figura 14A). Hubo una forma de proteína minoritaria contaminante de 30 kDa, inmunoprecipitada con Hermes-1, que se eliminó mediante ulterior filtrado de los inmunoprecipitados a través de un filtro de un límite de 50 kDa. Para normalizar la equivalencia molar de la proteína purificada utilizada en las pruebas de Stamper-Woodruff, se comparó la densidad óptica densitométrica (OD) de CD44 y de PSGL-1 marcado con metionina-[³⁵S] (cada uno pasado por un filtro de
15 límite de 50 kDa) en autorradiogramas de material purificado por inmutafinidad colocado sobre un cristal. Se encontró que la OD de 1 µg de PSGL-1 fue 2 veces mayor que la OD de 0, 75 µg de CD44. Dado que el monómero de PSGL-1 (140 kDa) tiene ~1, 4 veces mayor PM que CD44 (100 kDa) y dado que PSGL-1 tiene 2 veces más restos de metionina que CD44 (13 frente a 6), la señal dos veces mayor de PSGL-1 indicaba que 0, 75 µg de CD44 y 1 µg de PSGL-1 representan cantidades equimolares de las respectivas proteínas. Usando estas cantidades
20 equimolares, a 80 rpm CD44 sostenía una unión de linfocitos 10 veces mayor comparado con PSGL-1, y de 40 a 100 rpm, sostenía una adherencia linfocitaria 5-10 veces mayor comparado con PSGL-1 (Figura 14B). CD34 y L-selectina inmunoprecipitados de células KG1a (controles moleculares negativos) no sostuvieron ninguna adherencia linfocitaria mediada por L-selectina (Figura 14B). Estos datos comparando directamente las eficacias relativas de unión a L-selectina de CD44 y PSGL-1 purificadas fueron similares a los resultados obtenidos de un análisis de
25 células enteras.

Para explorar si las actividades de ligando para L-selectina dispares de HCELL y PSGL-1 estaban presentes también en las células humanas hematopoyéticas, se investigó la actividad de ligando para L-selectina de HCELL y PSGL-1 de un paciente con LMA sin maduración (M1). En ensayos de Stamper-Woodruff preliminares de
30 actividades de células enteras de LMA (M1), las células LMA (M1) mostraron una actividad de ligando para selectina-1 comparable a las células KG1a, y la expresión de CD44 y PSGL-1 (medida por citometría de flujo) fue también similar a la de KG1a. Se inmunoprecipitó CD44 y PSGL-1 de estas células y se examinó su capacidad de unión mediante la prueba de Stamper-Woodruff (80 rpm). En paralelo, también se evaluaron las actividades de ligando para L-selectina de HCELL y PSGL-1 de células KG1a y HL60, y se realizaron digestiones con N-glucosidasa-F y OSGE para análisis comparativo. CD44 tanto de KG1a como de LMA (M1) sostuvieron una
35 adherencia linfocitaria mediada pro L-selectina significativamente mayor que PSGL-1 de KG1a, HL60 o LMA (M1) (media de linfocitos unidos a CD44 3 veces mayor que a PSGL; $p < 0,001$) (Tabla 4). Además, ni CD44 de HL60 inmunoprecipitados control isotipo, inmunoprecipitados CD34 y L-selectina, o inmunoprecipitados de KG1a con CD44 y PSGL-1 tratados con neuraminidasa (Tabla 4) poseían ninguna actividad de ligando a L-selectina. De forma similar a que CD44 de células KG1a tratada con N-glucosidasa-F, la actividad de unión a L-selectina de CD44 de
40 LMA (M1) tratada con N-glucosidasa-F estuvo marcadamente reducida (a niveles de origen) (Tabla 4). De forma interesante, PSGL-1 aislada de células KG1a y blastos de LMA (M1) poseía una capacidad de unirse a L-selectina mayor que PSGL-1 de células HL60 (Tabla 4), aunque la unión a PSGL-1 nativa mediada por selectina-P fue idéntica entre células KG1a y HL60 (Figuras 13A y 13B). Fotomicrofotografías de linfocitos unidos a CD44 o PSGL-1
45 en pruebas de Stamper-Woodruff ilustraron las diferencias características entre en el rango de actividad de ligando para L-selectina de CD44 KG1a y CD44 LMA (M1) (Figuras 15A y 15D, respectivamente) comparado con PSGL-1 KG1a (Figura 15G); incluso con un exceso 3 veces molar de PSGL-1 KG1a (Figura 15H), la actividad de ligando para L-selectina de CD44 (Figura 15A) fue todavía mayor que la de PSGL-1. Los tratamientos con N-glucosidasa-F (Figuras 15B y 15E) y OSGE (Figura 15I) disminuyeron marcadamente la unión de linfocitos de forma comparable a
50 los niveles de control de isotipo (Figuras 15C y 15F) confirmando las contribuciones relevantes de N-glicanos y O-glicanos en HCELL y PSGL-1, respectivamente.

Tabla 4: Actividad de ligando para L-selectina de CD44 y PSGL-1 inmunoprecipitados de células KG1a, células HL60 y blastos de LMA (M1) en el ensayo de Stamper-Woodruff¹

Ligando para L-selectina celular	Número medio de linfocitos unidos ²
KG1a CD44	357,8 ± 36,6
N-glucosidasa-F CD44	30,7 ± 18,4*
Control de isotipo	23,3 ± 7,1*
PSGL-1	44,8 ± 6,7**
Control de isotipo	11,0 ± 1,6*

Ligando para L-selectina celular	Número medio de linfocitos unidos ²
CD34 (control molecular)	4,0 ± 2,0**
L-selectina (control molecular)	0,5 ± 0,6**
Control de isotipo	8,5 ± 3,5
HL60 CD44	6,5 ± 3,6
Control de isotipo	5,4 ± 2,3
PSGL-1	11,0 ± 2,1*
Control de isotipo	3,1 ± 2,9*
LMA (M1) CD44	425,3 ± 9,5
N-glicosidasa-F CD44	23,4 ± 6,1*
Control de isotipo	34,3 ± 4,1*
PSGL-1	141,5 ± 22,6**
Control de isotipo	19,5 ± 6,2*

¹Los linfocitos de conducto torácico de rata (1 x 10⁷/ml) se cubrieron en puntos fijados con glutaraldehído de CD44 purificado por inmutafinidad (Hermes-1), CD44 tratado con N-glicosidasa F, CD34 (QBEND-10), L-selectina (LAM 1-3) o control de isotipo (IgG de rata o IgG de ratón) (cada uno a 0,75 µg / punto), o PSGL-1 (PL-2) (1 µg / spot) y se incubaron en un agitador a 80 rpm a 4 °C.

²El número medio de linfocitos unidos de 5 campos de visión a un aumento de 100X, de portaobjetos por duplicado y un mínimo de tres experimentos. Cada experimento incluyó linfocitos tratados con anticuerpo anti-L-selectina (HRL-1; 10 µg / ml) o tratados con PMA y grupos de medio de ensayo que contienen EDTA 5 mM o puntos tratados con neuraminidasa de *Vibrio cholerae* (ligando), todos los cuales eliminaron por completo la unión de linfocitos (<0,8 número medio de linfocitos unidos).

*Diferencia estadísticamente significativa en la unión de linfocitos al inmunoprecipitado de tratamiento o isotipo en comparación con cada molécula de células sin tratar respectivas; prueba t de Student, p < 0,001.

**Diferencia estadísticamente significativa en la unión de linfocitos a estos grupos en comparación con la unión de los linfocitos a CD44 de KG1a y LMA (M1); prueba t de Student, p < 0,001.

Para profundizar en la mayor capacidad de HCELL para unirse a L-selectina en comparación con la de PSGL-1, se examinó la expresión de estructuras fucosiladas y sialiladas (reconocidas por el AcMo de rata HECA-452) en CD44 y en PSGL-1, la cual se correlaciona con la capacidad de unión a L-selectina. El análisis mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia con HECA-452 de cantidades equimolares de CD44 y PSGL-1 inmunoprecipitado de proteínas de membrana de KG1a revelaron que CD44 fue distintivamente más reactivo a HECA-452 que PSGL-1 (Figura 16), lo que sugiere que HCELL contiene un número mayor de epítopos HECA-452 que PSGL-1, lo que podría ser la explicación de su mayor actividad hacia L-selectina.

10 Ejemplo 11: Purificación por inmutafinidad de HCELL y PSGL-1

Se inmunoprecipitaron HCELL y PSGL-1 de células hematopoyéticas humanas. El procedimiento de inmunoprecipitación se siguió como está descrito (Dimitroff, C.J., Lee, J.Y., Fuhlbrigge, R.C. y Sackstein, R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (25), 13841-13846). Brevemente, las proteínas de membrana de células hematopoyéticas humanas (Dimitroff, C.J., Lee, J.Y., Fuhlbrigge, R.C. and Sackstein, R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (25) 13841-13846) se solubilizaron primero en NP-40 al 2 % y preaclaron en Proteína G-agarosa (Life Technologies). Luego la proteína de membrana se cuantificó usando la prueba de proteína de Bradford (Sigma). Las preparaciones de membrana preacladas y solubilizadas (incluyendo proteínas de membrana y lisados de células enteras radiomarcadas con [³⁵S]-metionina (Dimitroff, C.J., Lee, J.Y., Fuhlbrigge, R.C. and Sackstein, R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (25), 13841-13846) se incubaron con Ac PL-2 anti-PSGL-1 o con Ac monoclonal Hermes-1 anti-CD44 (una relación de 100 µg de proteína: 3 µg de anticuerpo) durante 18 horas a 4 °C en rotación. También se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpo QBEND-10, anti-CD34, anticuerpo (LAM1-3) anti-selectina-1 o controles de isotipo IgG de ratón/IgG de rata, para servir como controles negativos. La mezcla de lisado-anticuerpo se añadió a Proteína G-Agarosa y se incubó durante 1 hora bajo rotación constante. Para el SDS-PAGE/transferencia Western, los inmunoprecipitados se lavaron 5 veces con tampón de lisis/NP-40 al 2 %/SDS 1 %/BSA 1 % y 3 veces con tampón de lisis sin BSA, y hervidos en tampón de muestra reductor para su análisis. Para la valoración funcional de CD44 o PSGL-1 en pruebas de adherencia, los inmunoprecipitados respectivos se lavaron 5 veces con tampón de lisis/NP-40 al 2 %/SDS al 1 %/BSA al 1 % y tres veces con tampón de lisis sin NP-40, SDS o BSA, luego

suspendidos en PBS y hervidos durante 5 minutos para disociar CD44 o PSGL-1 de los inmunocomplejos. Luego se pasaron las fracciones eluidas a través de filtros Nicrocon® con un límite de 50 kDa (Fihser Scientific, Inc.). La concentración de proteína de la fracción retenida se midió por la prueba de determinación de proteína de Bradford.

5 Se realizaron experimentos paralelos en los que se incubaron los respectivos anticuerpos con Proteína G-agarosa, y se hirvieron los inmunoprecipitados en PBS como se ha mencionado arriba. Los eluidos analizados por SDS-PAGE y teñidos con azul Coomassie revelaron que > 99 % del anticuerpo estaba todavía unido a Proteína G-agarosa después de hervir en PBS y, por lo tanto contribuían insignificamente a los niveles de proteína cuantificados. Además, con la excepción de una banda menor contaminante a 30 kDa en los inmunoprecipitados de Hermes-1, otras proteínas no -CD44 y no-PSGL-1 no se aislaron por inmunoprecipitación usando Hermes-1 y PL-2 (ver autorradiogramas de inmunoprecipitados obtenidos de lisados de células enteras (7) de células KG1a radiomarcadas metabólicamente con [³⁵S], Figura 14A). El uso de un filtro de límite de 50 kDa retiró la proteína contaminante de 30 kDa inmunoprecipitada por Hermes-1, produciendo CD44 KG1a pura.

15 Para confirmar la contribución de los N-glicanos en HCELL o O-sialoglicanos en PSGL-1, las preparaciones de membrana se trataron primero con N-glucosidasa-F (0, 8 U/ml) o OSGE previamente a la inmunoprecipitación como se ha descrito (Dimitroff, C.J., Lee, J.Y., Fuhlbrigge, R.C. and Sackstein, R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (25), 13841-13846). El material purificado por inmutafinidad (0, 75-3 µg/gota) se esparció sobre portaobjetos para el análisis mediante la prueba de Stamper-Woodruff (ver abajo para la descripción de la prueba). Para el análisis autorradiográfico del inmunoprecipitado de CD44 y PSGL-1 radiomarcados con [³⁵S]-metionina, se esparcieron los inmunoprecipitados sobre portaobjetos, se dejaron secar y se expusieron a una película Kodak BioMax-MR durante 12 horas a -80 °C. El análisis densitométrico (densidad óptica) de los autorradiogramas se realizó con un escáner Hewlett-Packard Scanjet 5200 y con el programa de procesamiento y análisis NIH Image.

25 **Ejemplo 12: Análisis por RT-PCT de α1, 3 fucosiltransferasas (FucTIV y FucTVII) y α2, 3 sialiltransferasa (ST3GALIV)**

Dado que la expresión de HECA-452 es dependiente de sialofucosilaciones críticas en las cadenas del núcleo poli-N-acetilactosaminil, se investigó si la diferencia relativa en la expresión del epítipo HECA-452 y la actividad de ligando para L-selectina era una consecuencia de la activación de α2, 3 sialiltransferasa (ST-Gal IV) y las α1, 3 fucosiltransferasas leucocitarias (FucTIV y FucTVII), las cuales se requieren para la síntesis del epítipo HECA-452 (Sasaki, K., Watanabe, E., Kawashima, K., Sekine, S., Dohi, T., Oshima, M., Hanai, N., Nishi, T. y Hasegawa, M. (1993) *J. Biol. Chem.* 268 (30), 22782-22787; Fuhlbrigge, R.C., Kieffer, D., Armending, D. y Kupper, T.S. (1997) *Nature* 398, 978-981; Zollner, O. y Vestweber, D.M. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 33002-33008; Goelz, S., Kumar, R., Potvin, B., Sundaram, S., Brickelmaier, M. y Stanley, P. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 1033-1040).

Se extrajo el ARN total con el reactivo Trizol® LS de acuerdo con el protocolo del fabricante (Gibco, Life Sciences) y se utilizó en el sistema Titan™ One Tube RT-PCR System (Roche Molecular Biochemicals). Se usaron cebadores ST3Gal sentido 5'-ctctccgatatctgttttttccatccagagagaagaagaaggag-3' y anti-sentido 5'-gattaaggtaccaggtcagaaggacgtgaggttcttct-3' y condiciones de ciclado térmico [RT a 52 °C durante 45 minutos, 1 ciclo a 94 °C durante 2 minutos, 30 ciclos a 94 °C durante un minuto, 57 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 2 minutos, y un ciclo de 68 °C durante 7 minutos] para amplificar un fragmento de ADNc de ST3GalIV de 0,96 kb. Para amplificar un fragmento de FucTVII (GenBank, n.º de acceso U08112), se utilizaron cebadores específicos, sentido 5'-cccaccgtggccagctacgcttct-3' y anti-sentido 5'-ctgacctctgtgccagctcccg-3' y condiciones de ciclado térmico [RT a 52 °C durante 45 minutos, 1 ciclo a 94 °C durante 2 minutos, 30 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 1 minuto, y un ciclo de 68 °C durante 7 minutos]. Usando condiciones idénticas de RT y de ciclado térmico, se generó un fragmento de ADNc de FucTIV de 0,50 kb de cebadores sentido 5'-cgggtgtgccaggctgtacagagg-3' y anti-sentido 5'-tcgggaacaggtgtgtat gagatt-3' (GenBank, n.º de registro #M58597).

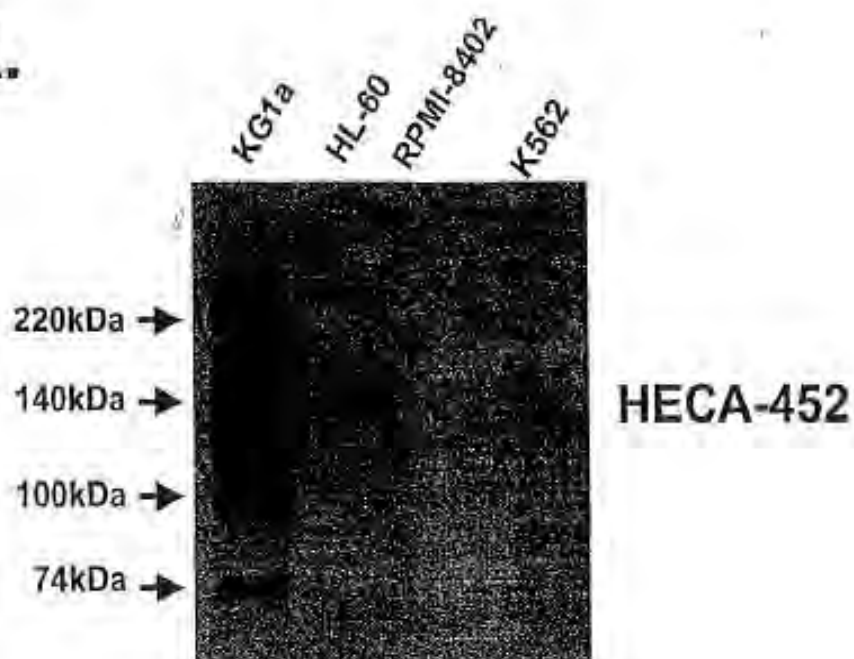
50 El análisis por RT-PCR de la expresión de genes de FucTIV y FucTVII y de ST3GalIV en KG1a, HL60, K562 y RPMI-8402 mostró que la expresión de FucTIV fue relativamente similar en todas las líneas celulares (Figuras 17A y 17B), pero la expresión de FTVII fue la más alta en las células HL60 y KG1a (línea 1, FucTIV, y línea 2, FucTVII; Figura 17^a). De forma interesante, ST3Gal IV (calle 1; Figura 6B) se expresó a un nivel alto en células KG1a y a muy bajo nivel en todas las otras líneas, lo que sugiere que el nivel inherente de ST3GalIV puede ayudar a regular la expresión de estructuras reactivas a HECA-452 y determinantes de unión para L-selectina en CD44 y/o PSGL-1.

La expresión de HECA-452 es dependiente de silofucosilaciones críticas en las cadenas core poliacetilactosaminil. La diferencia en la expresión de epítipos HECA-452 y actividad de ligando para L-selectina fue una consecuencia de la activación de α2, 3 sialiltransferasa (ST3GalIV) y leucocitarias α1, 3 fucosiltransferasas (FucTIV y FucTVII), las cuales se requieren para la biosíntesis de epítipos HECA-452. El análisis de la expresión génica por RT-PCR de FucTIV y FucTVII y de ST3Gal IV en las células KG1a, HL60, K562 y RPMI-8402 mostró que la expresión de FucTVII fue más alta en las células HL60 y KG1a (línea 1, FucTIV, y línea 2, FucTVII; Figura 17A). De forma interesante, ST3Gal IV (línea 1; Figura 17B) se expresó a un nivel alto en células KG1a y a un nivel muy bajo en las otras líneas celulares, sugiriendo que el nivel inherente de ST3Gal IV puede ayudar a regular la expresión de estructuras relevantes reactivas a HECA-452 y determinantes de unión para L-selectina críticos en CD44 KG1a y/o PSGL-1.

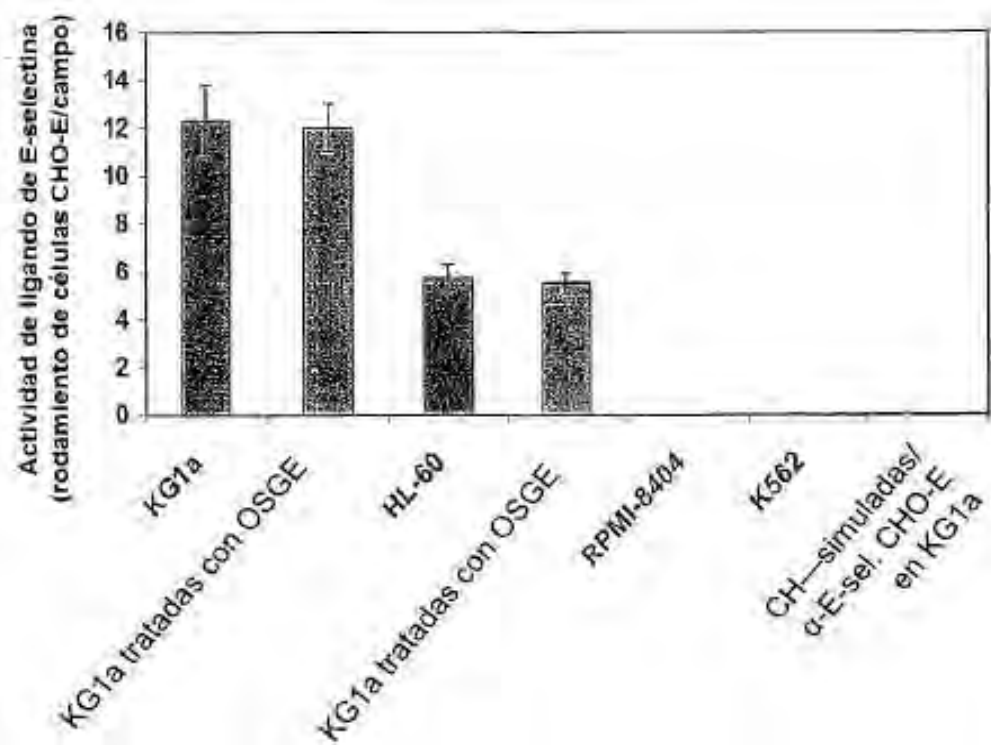
REIVINDICACIONES

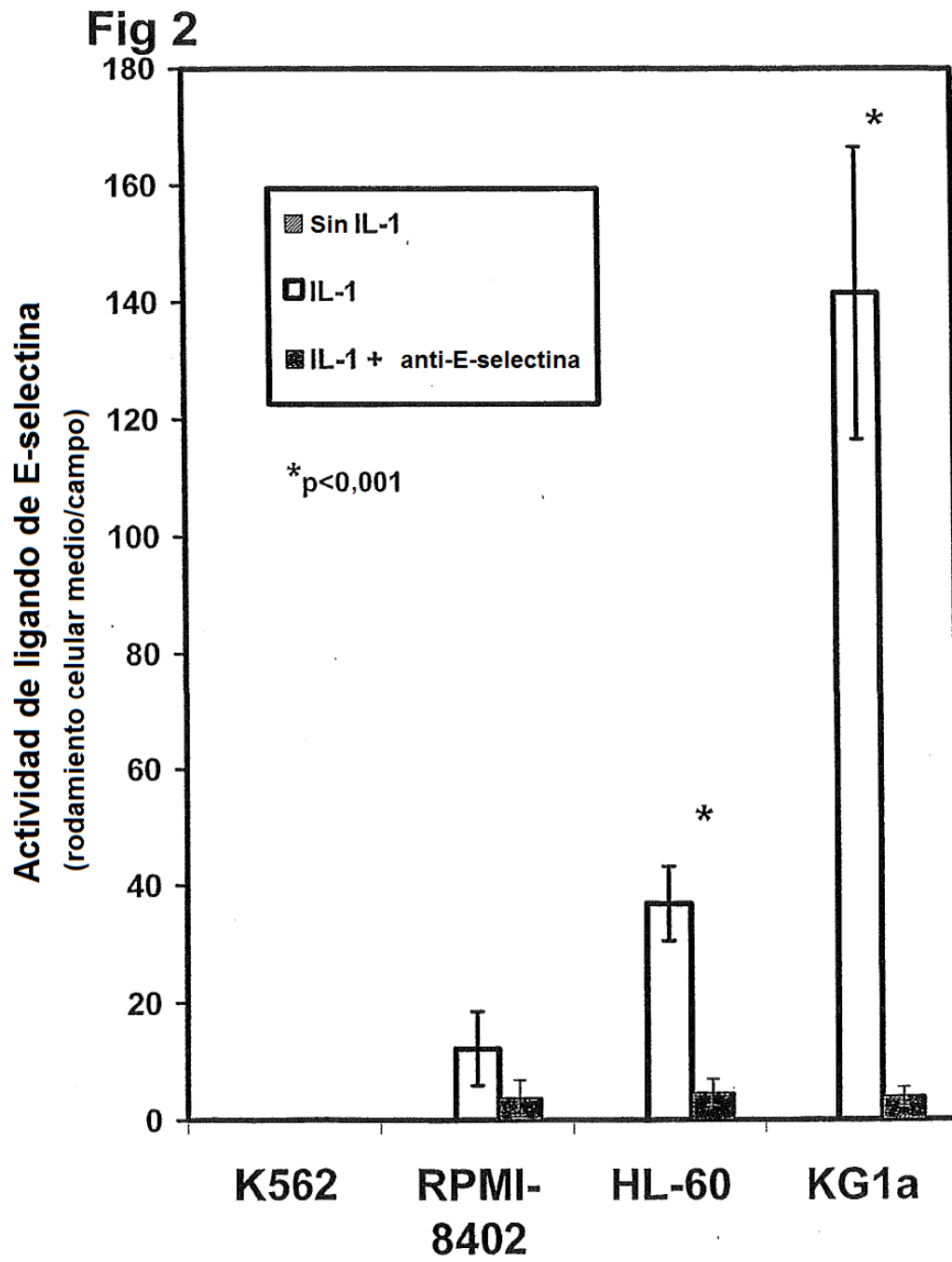
1. Una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende un polipéptido glicosilado, comprendiendo dicho polipéptido glicosilado una cadena principal del polipéptido CD44 que muestra glicanos sialilados y fucosilados y se une a la E-selectina y a la L-selectina.
2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que el polipéptido glicosilado o la estructura principal del polipéptido CD44 glicosilado comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o comprenden la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % similar a la SEQ ID NO: 1.
3. La proteína de fusión de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el polipéptido glicosilado o el polipéptido CD44 glicosilado muestran glicanos fucosilados y sialilados reactivos a HECA-452.
4. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, cáncer o un trastorno hematopoyético en un sujeto.
5. Una población de células, en la que dichas células son células madre o células progenitoras hematopoyéticas para su uso en el tratamiento de trastornos hematopoyéticos, trastornos inflamatorios, trastornos genéticos, cáncer o trastornos susceptibles de tratamiento con una célula madre, teniendo dichas células un polipéptido glicosilado, comprendiendo dicho polipéptido glicosilado una cadena principal del polipéptido CD44 que muestra glicanos sialilados y fucosilados que se unen a E-selectina y a L-selectina, teniendo la población un mayor nivel de expresión del polipéptido glicosilado en relación con poblaciones nativas de células de ese tipo, con la condición de que la población no sea una población de células madre embrionarias humanas.
6. Una población de células para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dichas células son células madre con la condición de que la población de células no sea una población de células madre embrionarias humanas.
7. Una población de células para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dichas células son células madre de origen ectodérmico.
8. Una población de células para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dichas células son células madre de origen endodérmico.
9. Una población de células para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dichas células son células madre o células progenitoras hematopoyéticas de origen mesodérmico.
10. Una población de células para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dichas células son células progenitoras hematopoyéticas.
11. Una población de células para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en la que el polipéptido glicosilado o la estructura principal del polipéptido CD44 glicosilado comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o comprenden la secuencia de aminoácidos al menos un 95 % similar a la SEQ ID NO: 1.
12. Una población de células para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en la que el polipéptido glicosilado o la estructura principal del polipéptido CD44 glicosilado muestran glicanos fucosilados y sialilados reactivos a HECA-452.
13. Una composición farmacéutica, que comprende la proteína de fusión de inmunoglobulina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, cáncer o un trastorno hematopoyético en un sujeto.

1A.

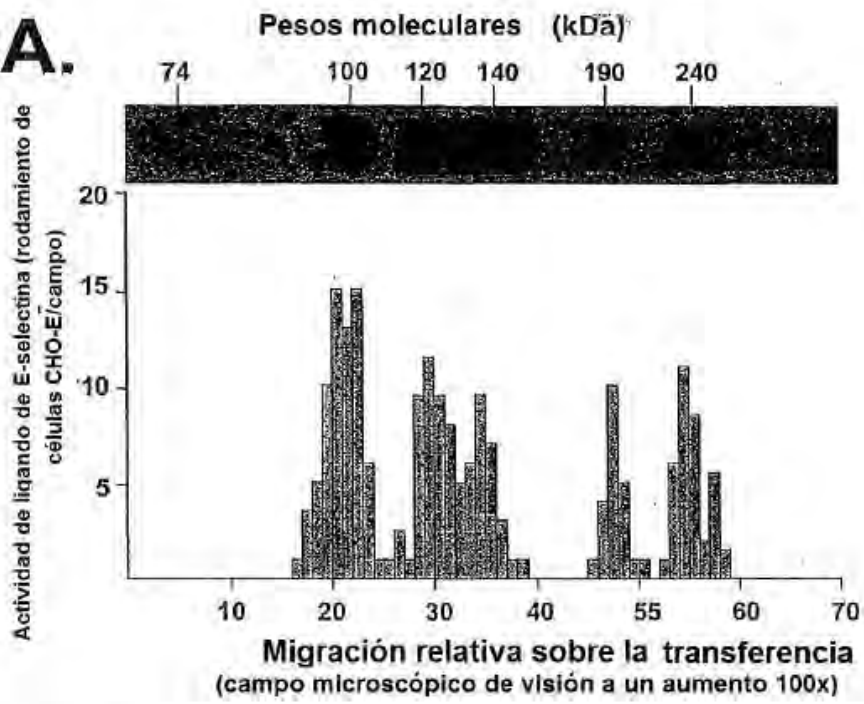


1B.

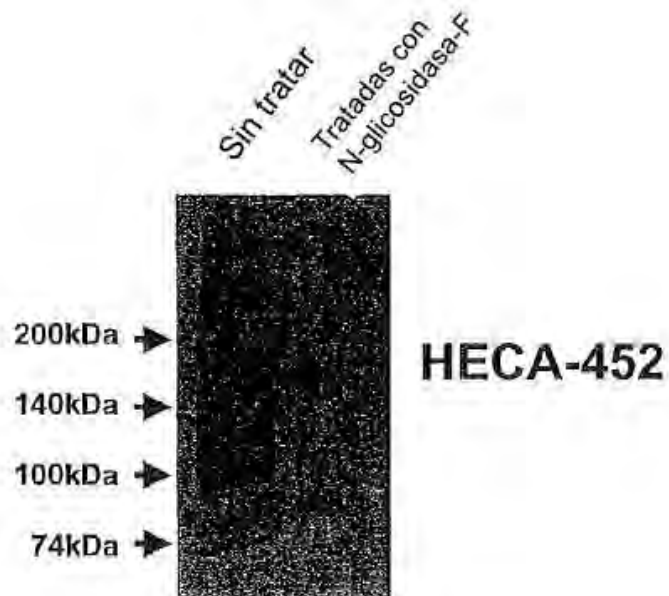


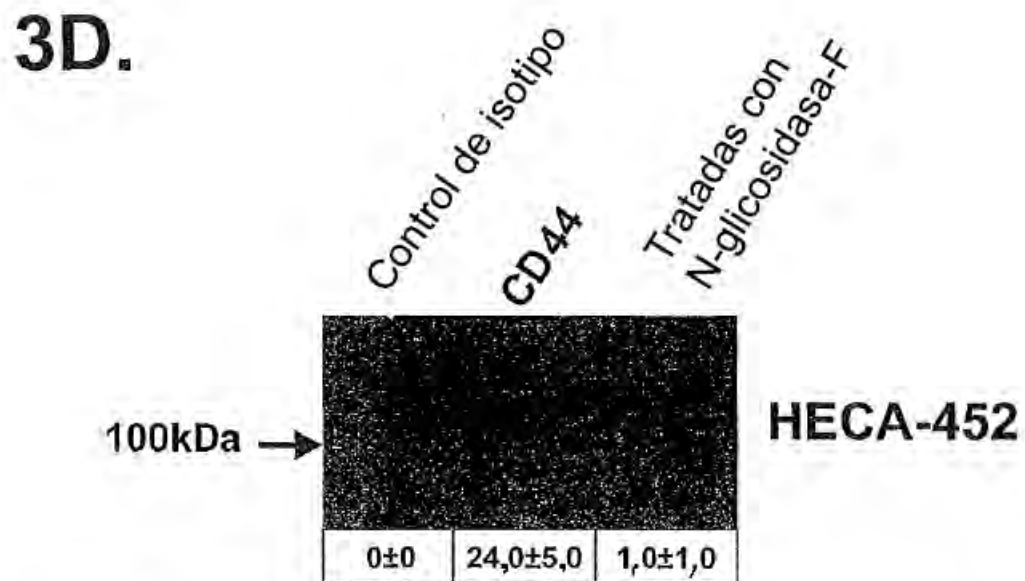
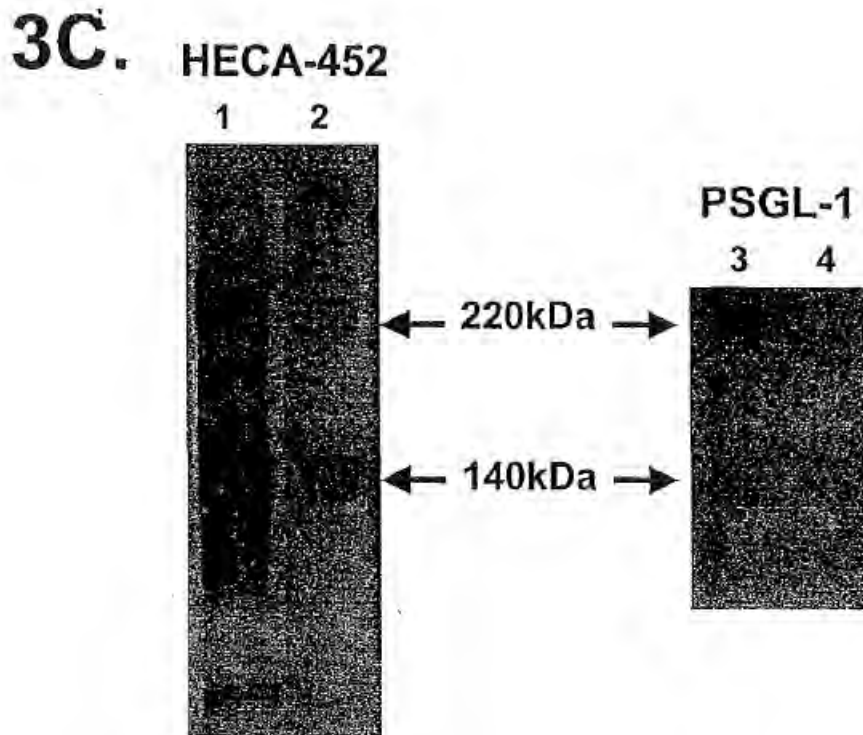


3A.



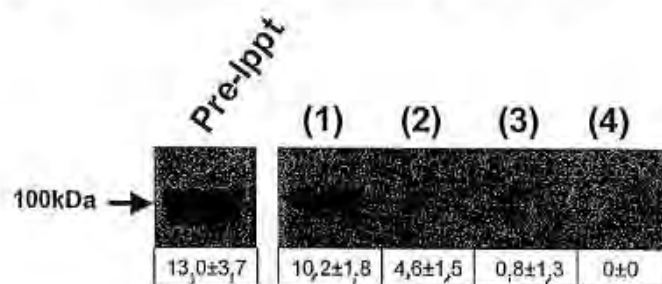
3B.





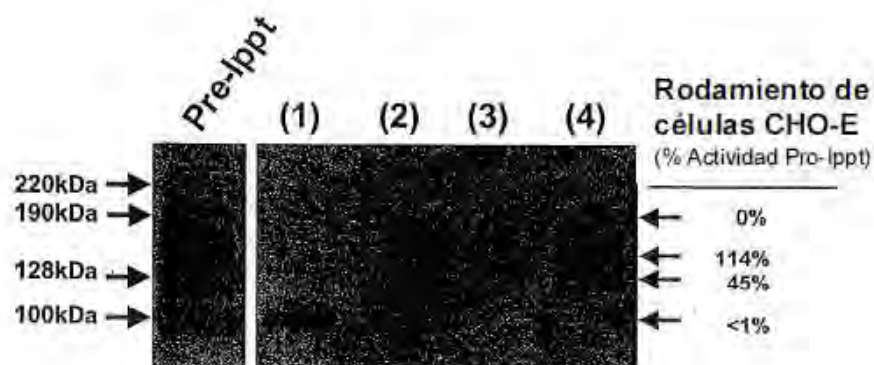
Actividad de ligando de E-selectina
(Media +/- SD. Rodamiento de células CHO-E en la banda de 100 kDa)

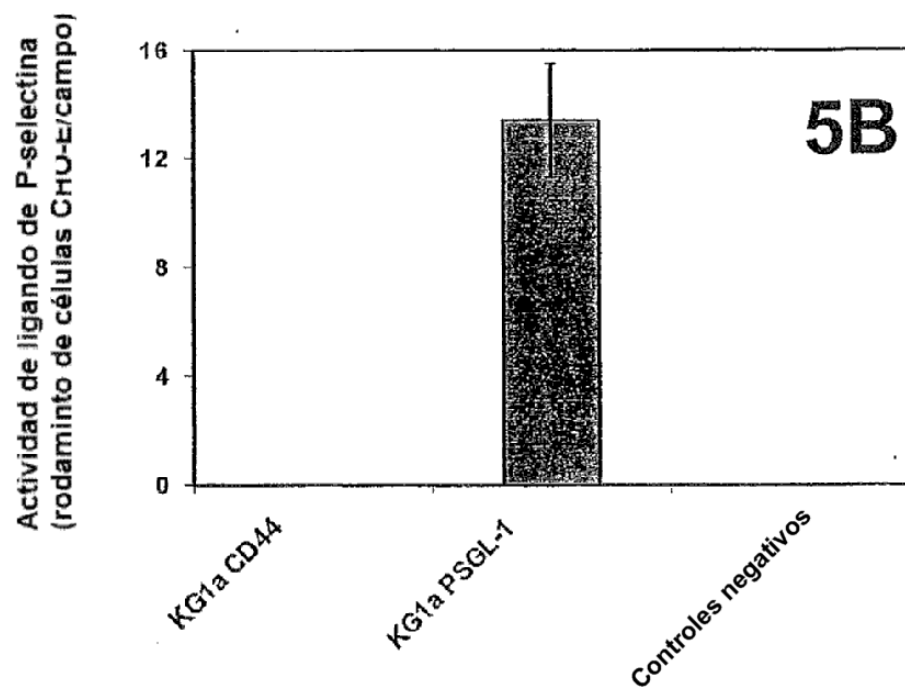
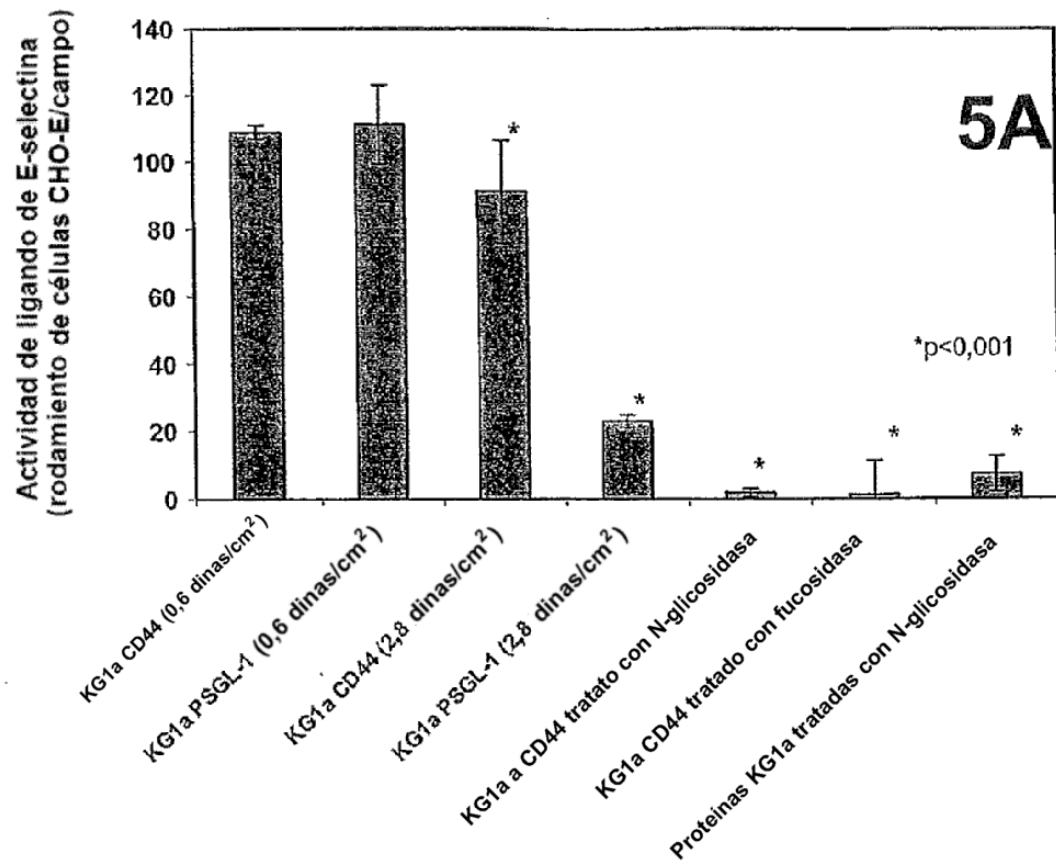
4A. Inmunotransferencia con Hermes-1



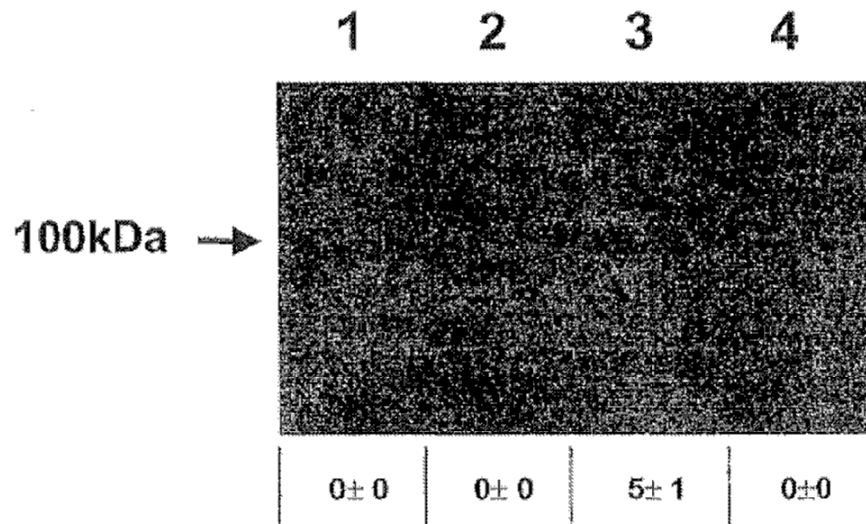
Actividad de ligando de E-selectina
(media +/-SD. Rodamiento de células CHO-E sobre la banda de 100 kDa)

4B. Inmunotransferencia con HECA-452





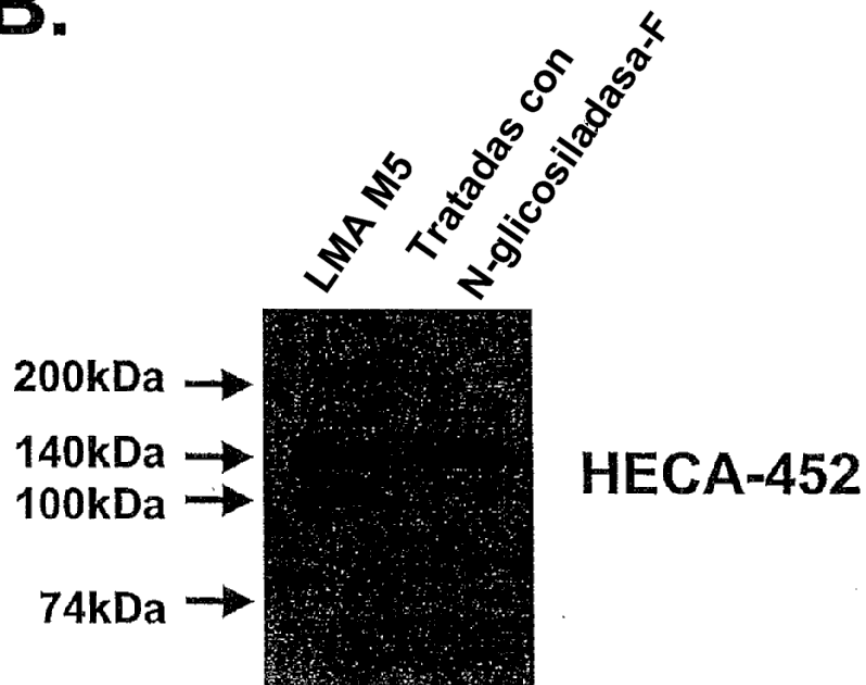
6A.



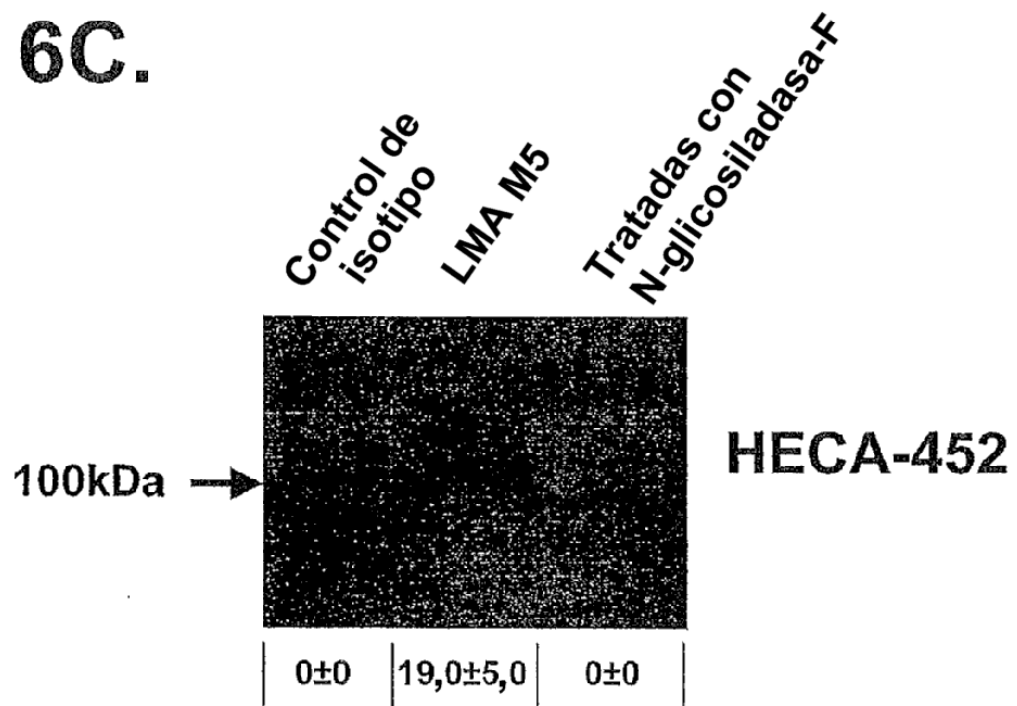
Actividad de ligando de E-selectina

(media +/-SD. Rodamiento de células CHO-E sobre la banda de 100 kDa)

6B.

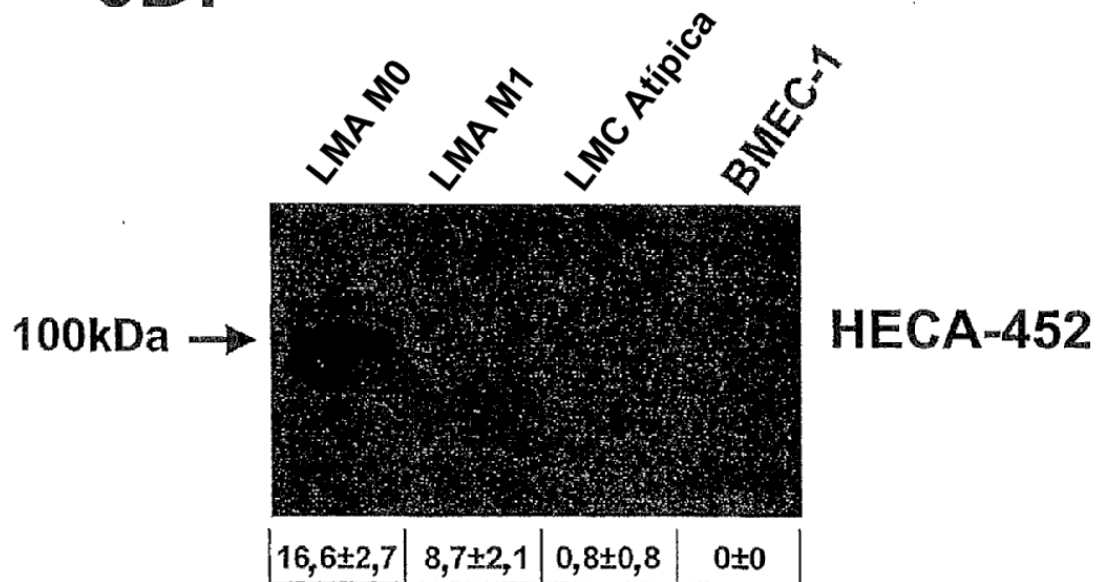


6C.



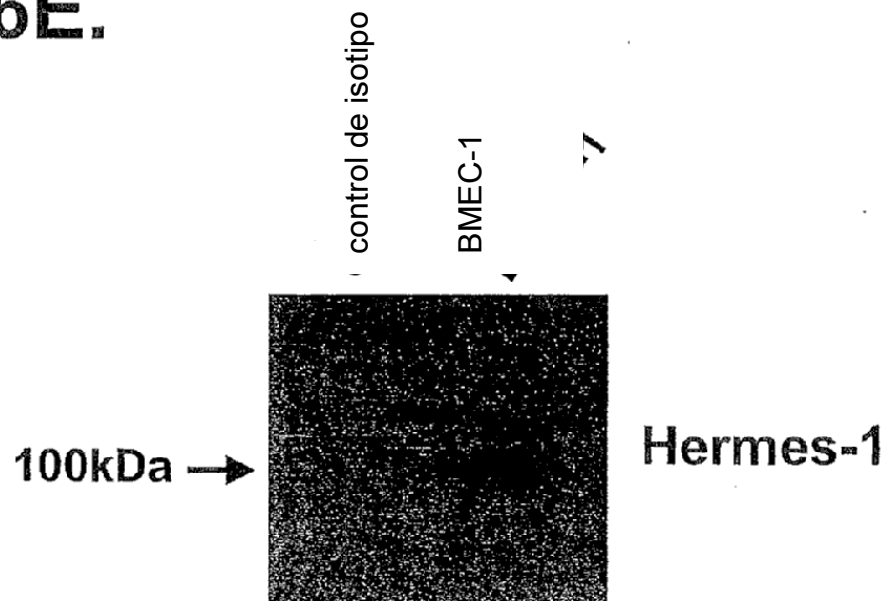
Actividad de ligando de E-selectina
(media +/-SD. Rodamiento de células CHO-E sobre la banda de 100 kDa)

6D.



Actividad de ligando de E-selectina
(media +/-SD. Rodamiento de células CHO-E sobre la banda de 100 kDa)

6E.



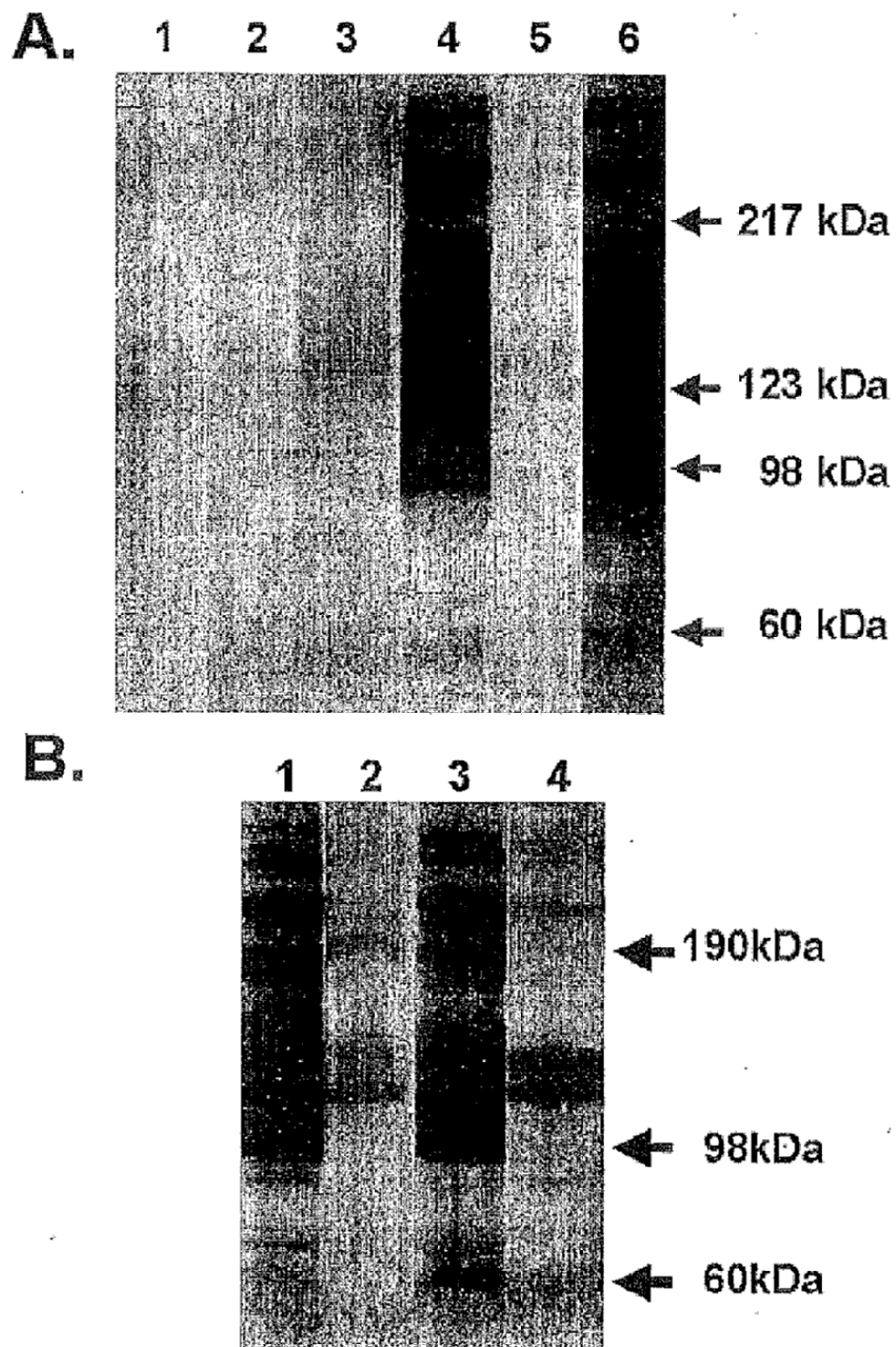


FIGURA 7

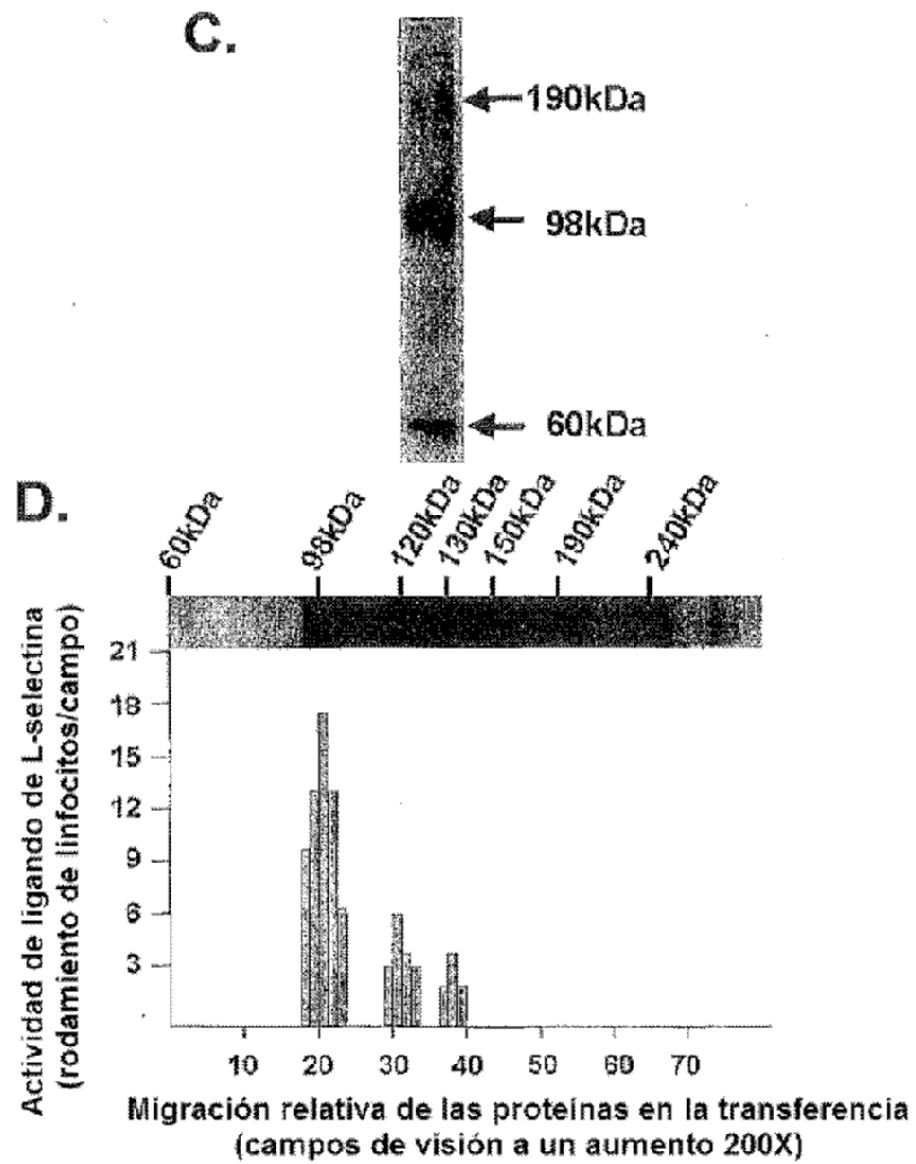


FIGURA 7

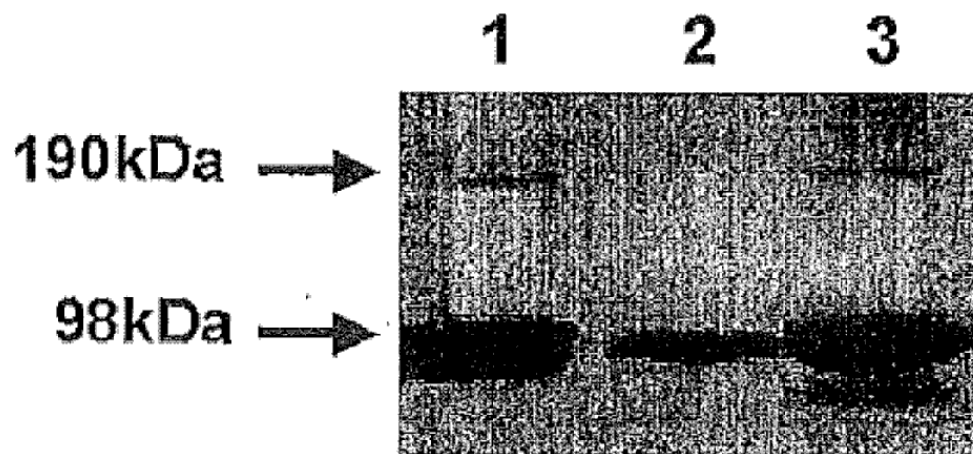


FIGURA 8

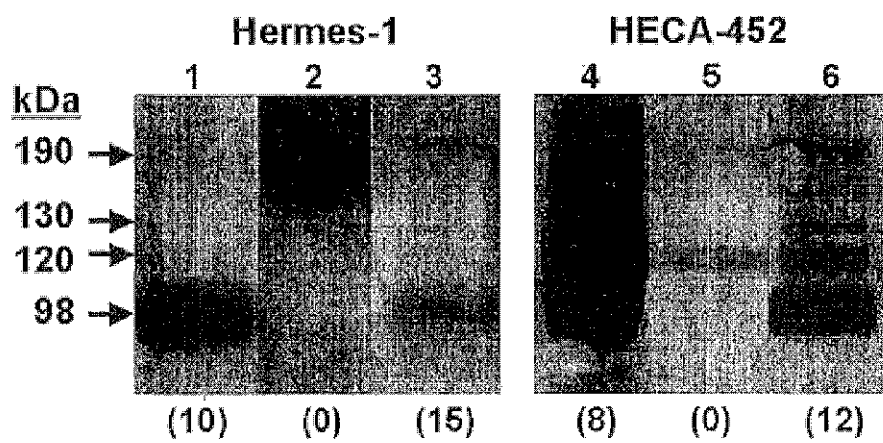


FIGURA 9

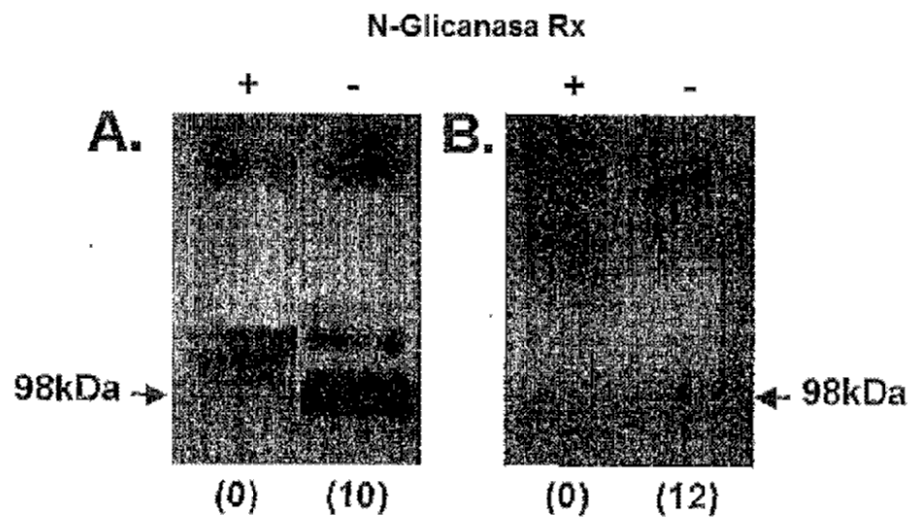


FIGURA 10

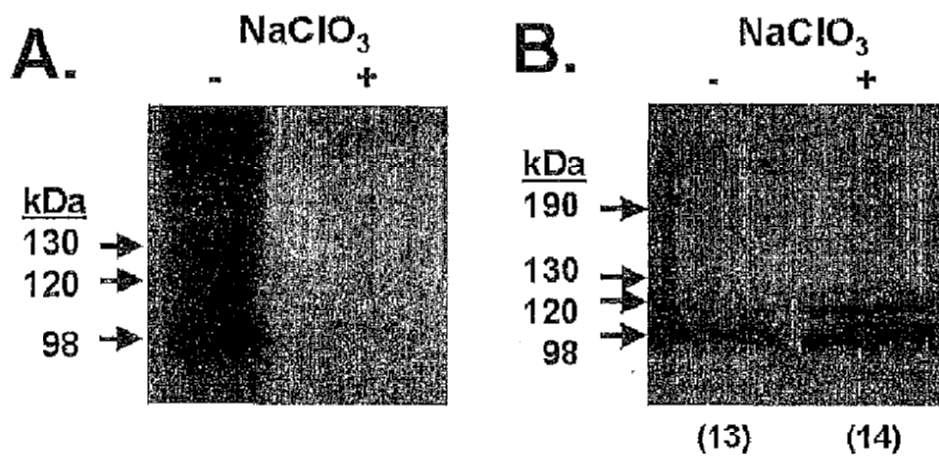


FIGURA 11

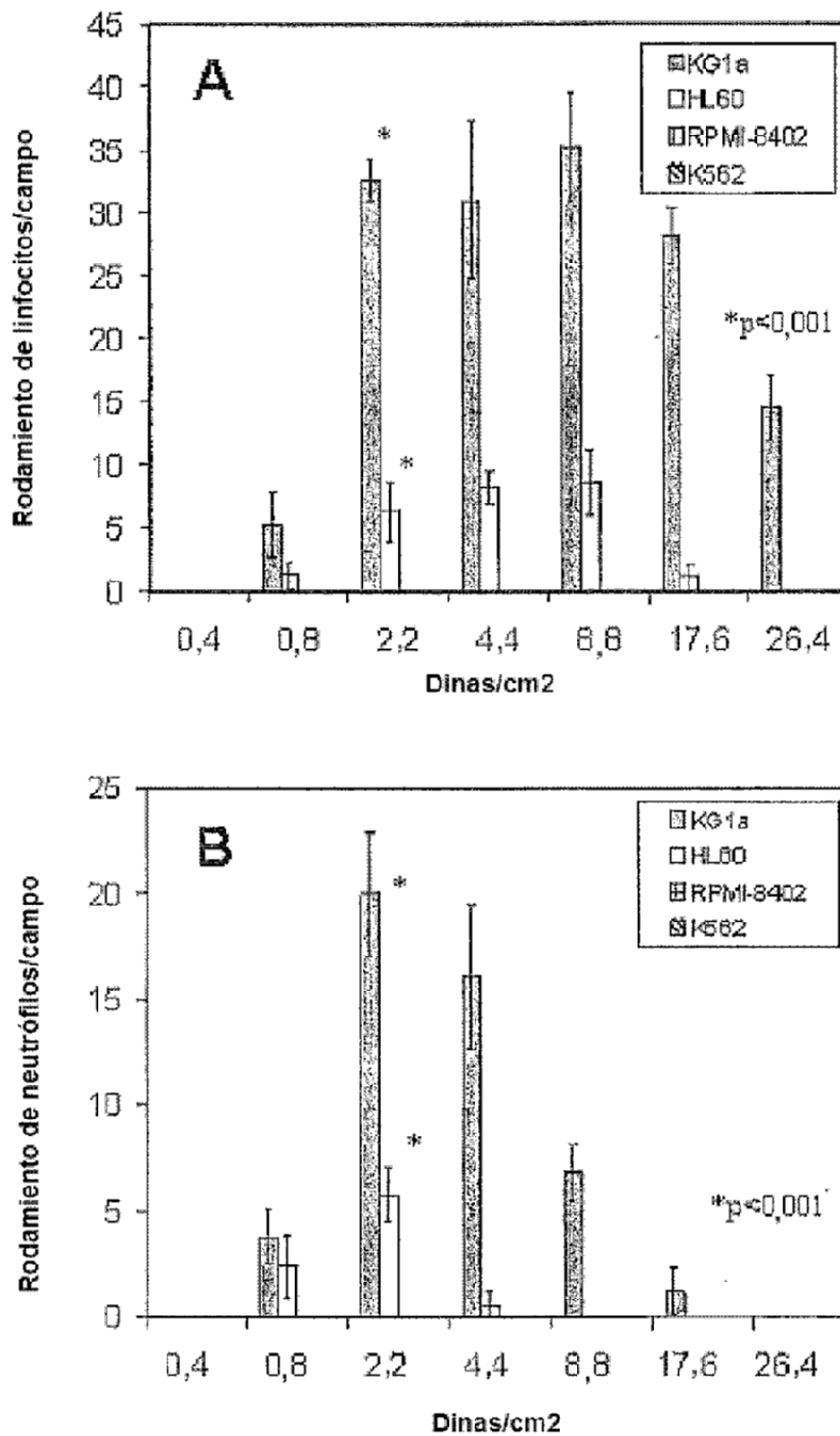


FIGURA 12

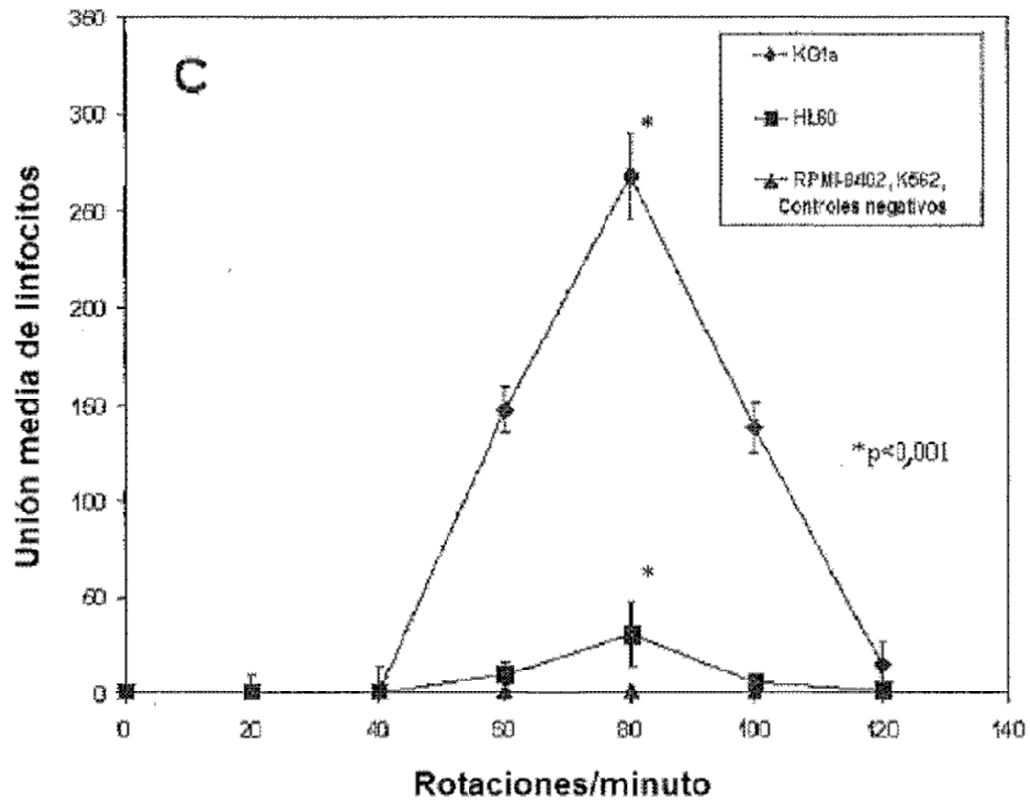


FIGURA 12

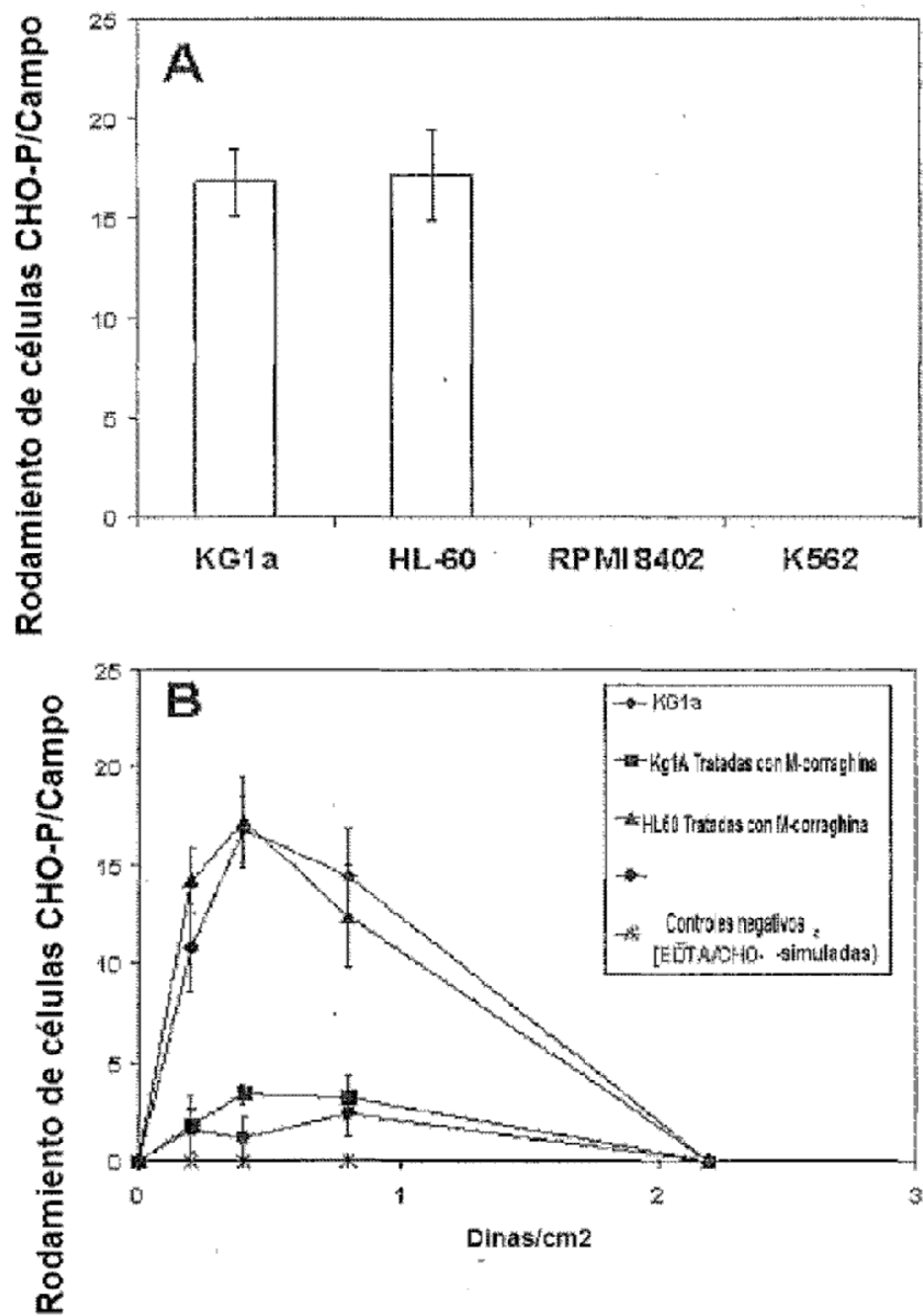


FIGURA 13

A. Autorradiografía de inmunoprecipitados Hermes-1 (CD44) y PL-2 (PSGL-1) de lisado de células KG1a marcados con $[^{35}\text{S}]$

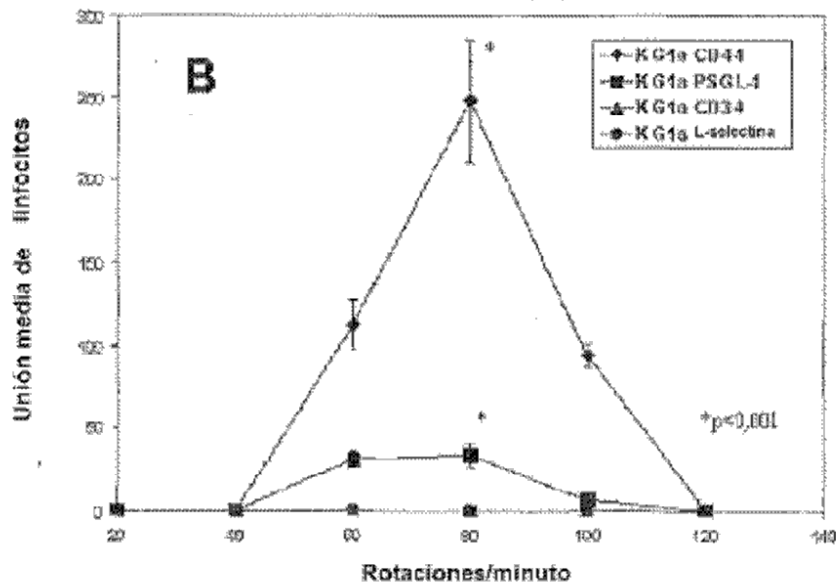
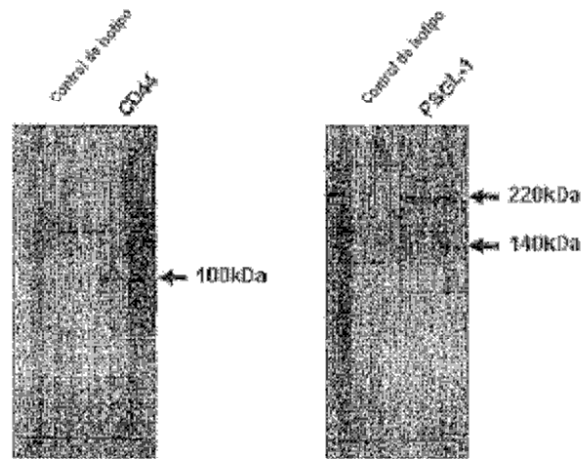


FIGURA 14

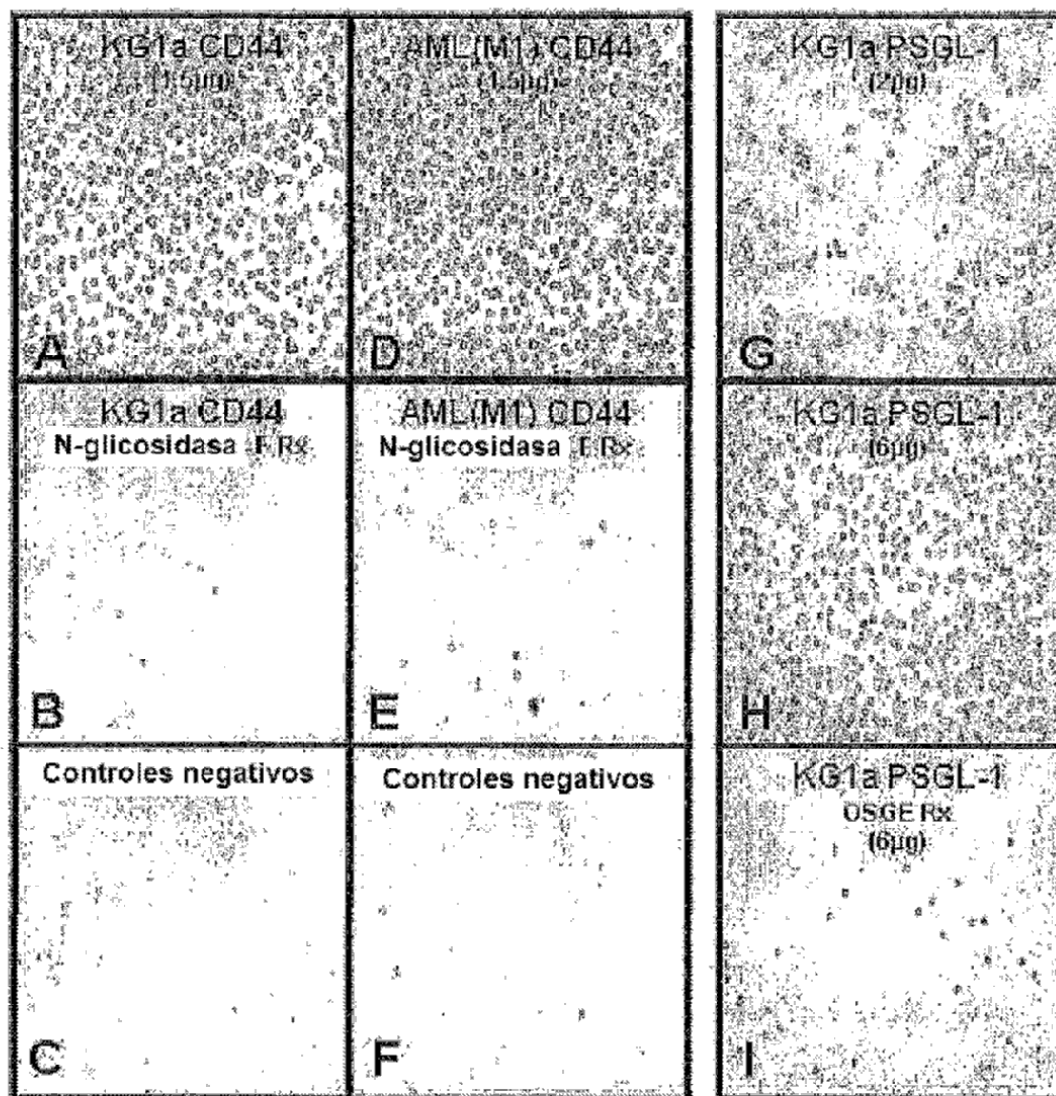


FIGURA 15

Inmunotransferencia HECA-452

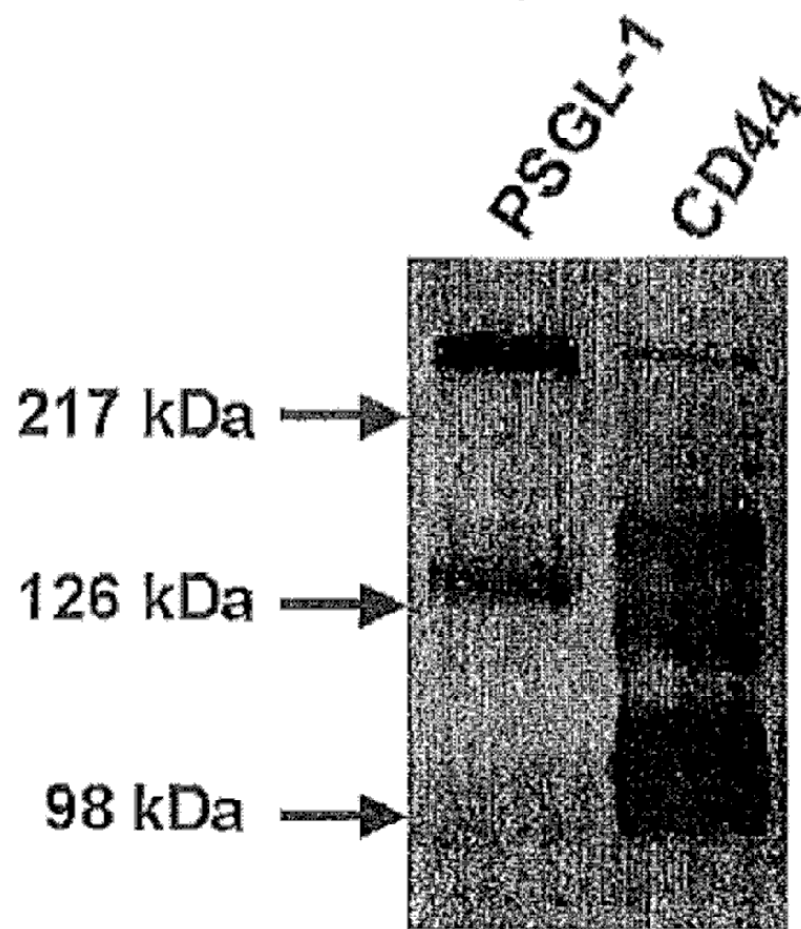


FIGURA 16

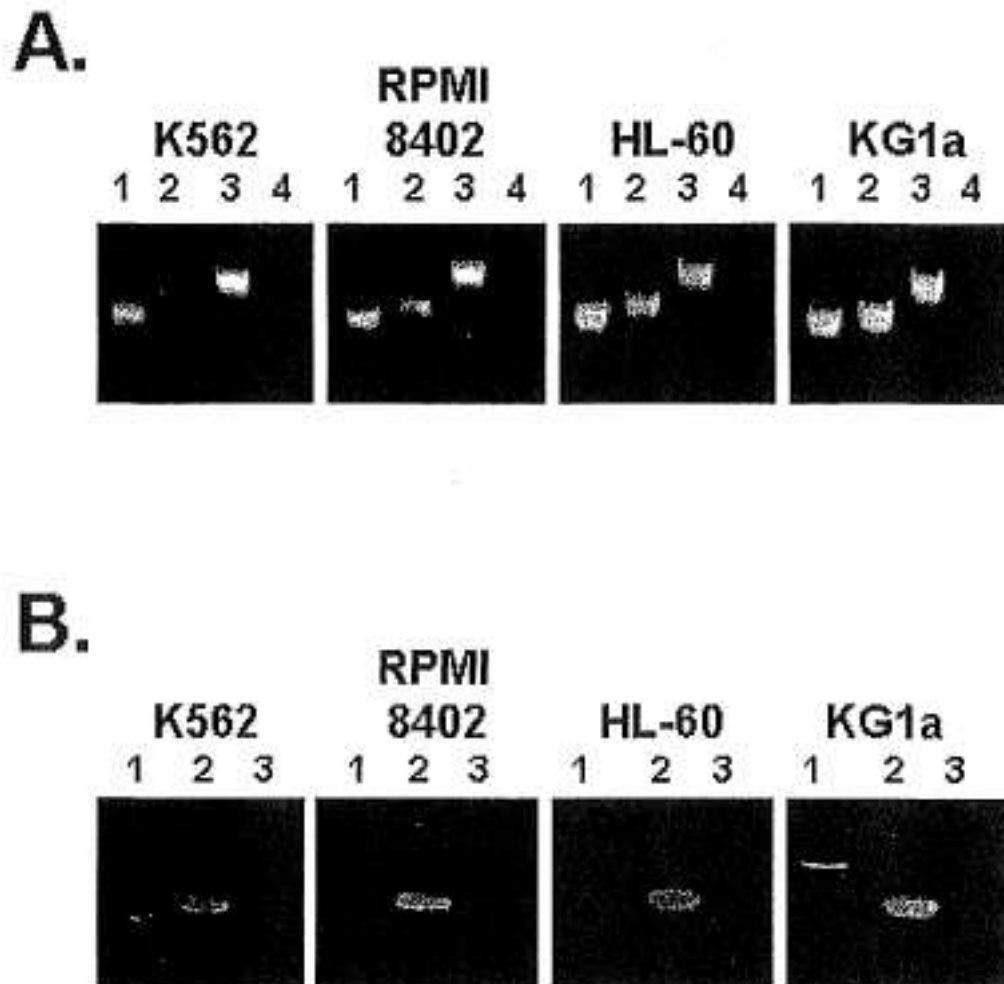


FIGURA 17