(19) INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 639224 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12N015/12 A C07K014/00 B
C12N015/62 B C12P021/08 B
C12N005/10 B A61K038/00 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1993.04.28

(30) *Prioridade:* 1992.04.30 US 879036
1992.10.01 US 956701

(43) *Data de publicação do pedido:*
1995.02.22

(45) *Data e BPI da concessão:*
2000.06.28

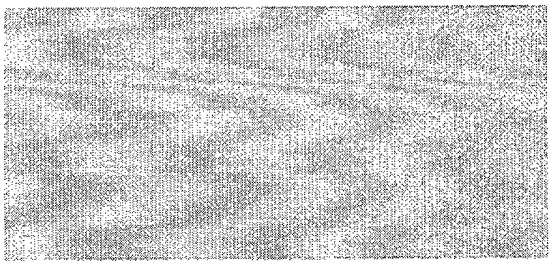
(73) *Titular(es):*
GENENTECH, INC.
460 POINT SAN BRUNO BOULEVARD SOUTH S.FRANCISCO, CALIF.94080 US

(72) *Inventor(es):*
DAVID V. ERBE US
LAURENCE A. LASKY US
LEONARD G. PRESTA US

(74) *Mandatário(s):*
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* VARIANTES DO DOMÍNIO DE LECTINA DA SELECTINA

(57) *Resumo:*



DESCRIÇÃO

"Variantes do domínio de lectina da selectina"

Antecedentes do invento

I. *Âmbito do invento*

O presente invento refere-se a variantes de selectina. O invento refere-se ainda a ácidos nucleicos que as codificam e a métodos e meios para a sua preparação.

II. *Descrição dos antecedentes e arte relacionada*

As selectinas são moléculas de adesão celular que estão unificadas estruturalmente, pela inclusão de domínios de lectina, do tipo egf e do tipo ligação ao complemento [Bevilacqua, M.P. *et al.* Science 243, 1160-1165 (1989); Johnson, *et al.*, Cell 56, 1033-144 (1989); Lasky, L.A., Cell 56, 1045-1055 (1989); Siegelman, M. *et al.*, Science 243, 1165-1172 (1989); Stoolman, L.M., Cell 56, 907-910 (1989)] e funcionalmente, pela sua capacidade de mediar a ligação celular através de interacções entre os seus domínios de lectina e ligandos de hidratos de carbono na superfície celular [Brandley, B. *et al.* Cell 63, 861-863 (1990); Springer, T. and Lasky, L.A. Nature 349 196-197 (1991)].

Foram identificados até agora três membros da família das selectinas, entre as moléculas de adesão celular: L-selectina (a.k.a. receptor de encaminhamento de nódulos linfáticos periféricos (pnHR), LEC-CAM-1, LAM-1, $gp90^{MEL}$, $gp100^{MEL}$, $gp110^{MEL}$, antigénio de MEL-14, antigénio de Leu-8, antigénio de TQ-1, antigénio de DREG), E-selectina (LEC-CAM-2, LECAM-2, ELAM-1) e P-selectina (LEC-CAM-3, LECAM-3, GMP-140, PADGEM). As estruturas dos membros da família da selectina estão ilustrados na Figura 9.

A L-selectina encontra-se nos leucócitos e está envolvida no tráfego de linfócitos para tecidos linfóides periféricos [Gallatin *et al.*, Nature 303, 30-34 (1983)) e com respostas inflamatórias agudas mediadas por neutrófilos [Watson, S.R., Nature 349 164-167 (1991)]. A sequência de aminoácidos de L-selectina e a sequência de ácidos nucleicos codificante estão, descritas, por exemplo na Patente U.S. Nº 5,098,833 concedida em 24 de Março de 1992. A L-selectina parece reconhecer ligandos de hidratos de carbono sialilados, fucosilados, sulfatados, em pelo menos duas glicoproteínas endoteliais [True D.D. *et al.* J. Cell Biol. 111, 2757-2764 (1990); Imai Y. *et al.* J. Cell Biol 113, 1213-1221 (1991)],

tendo uma destas sido recentemente clonada [Lasky, L.A. *et al.* Cell (1992), pedido U.S. co-pendente e em impressão, com o Nº de série 07/834,902, depositada em 13 de Fevereiro de 1992].

A E-selectina é uma molécula de adesão endotelial que é induzida por vários estímulos inflamatórios [Bevilacqua, P.P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 9238-9242 (1987); Luscinakas, F.W. *et al.* J. Immunol. 142, 2257-2263 (1589); Kuijpers, T.W. *et al.*, J. Immunol. 147 1369-1376 (1991)]. Na patente U.S. Nº 5,081,034 concedida em 14 de Janeiro de 1952, está descrito um gene clonado que codifica para a E-selectina (ELAM-1). A E-selectina reconhece o hidrato de carbono de superfície celular de monócito e neutrófilo, o sialilo Lewis x (sLex) [Lowe J.B. *et al.*, Cell 63, 475-484 (1990); Phillips, M.L. *et al.*, Science 250 1130-1132 (1990); Walz, G.A. *et al.* Science 250 1132-1135 (1990); Tiemeyer, M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 1138-1142 (1991)] e, além disso, pode estar também envolvida no reconhecimento de um hidrato de carbono do tipo sLex, na superfície de um subconjunto de linfócitos de encaminhamento para a pele [Picker, L.J. *et al.*, Nature 349 769-799 (1991); Shimizu, Y. *et al.* Nature 349, 799-802 (1991)]. O hidrato de carbono relacionado com sLex de menor tamanho, reconhecido pela E-selectina é um tetrassacárido com a estrutura ácido siálico alfa 2-3 galactose beta 1-4 N-acetil glucosamina (fucose alfa 1-3) [Tyrrell, D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10372-10376 (1991)].

A P-selectina encontra-se em grânulos alfa de plaquetas e em corpos "Weible-Palade" de células endoteliais [Bonfanti, R. *et al.* Blood 73, 1109-1112 (1989); McEver, R. *et al.* J. Clin. Inv. 84, 92-99 (1989)]. A sua expressão à superfície é induzida após minutos de exposição a trombina, substância P, histamina ou peróxido e parece reconhecer um hidrato de carbono que ou é idêntico ou é estreitamente relacionado com o sLex, em ambas as superfícies celulares de neutrófilo e monócito [Larsen, E. *et al.*, Cell 59, 305-312 (1989); Larsen, E. *et al.* Cell 63 467-474 (1990); Moore, K.L. *et al.* J. Cell Biol 112, 491-499 (1991); Polley, M.J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 6224-6228 (1991)]. A sequência de aminoácidos e a sequência nucleotídica codificante da P-selectina estão descritas em Johnston *et al.* Cell 56, 1033-1044 (1989).

Os domínios de lectina das L-, E- e P-selectinas apresentam uma homologia de sequências e semelhanças estruturais consideráveis. De particular relevância é a conservação dos resíduos de cisteína (Cys) nas posições de aminoácidos 19, 90, 109 e 117 dos domínios de lectina da selectina, o que resulta numa estrutura tridimensional que compreende duas dobras ligadas por dissulfureto, definidas por ligações dissulfureto, formadas entre a Cys19 e Cys117 e Cys90 e Cys109, respectivamente.

Têm-se reunido muitas evidências que indicam semelhanças na natureza dos ligandos de hidratos de carbono, reconhecidos pelas selectinas. No caso de todas as três selectinas, as interacções adesivas entre os seus domínios de lectina e ligandos de hidratos de carbono requer a presença de resíduos de ácido siálico fucose ligados em alfa 2-3 [Brandley, B. *et al.* Cell 63,861-863 (1990); Corrall, L. *et al.* Biochem Biophys Res. Commun. 172, 1349-1352 (1990); Springer, T. and Lasky, L.A. Nature 349 196-197 (1991); Tyrrell, D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10372-10376 (1991)]. As interacções adesivas entre os domínios de lectina da selectina e os seus ligandos de hidratos de carbono podem ser relativamente fracos, uma vez que se verificou que a L- e P-selectina estão envolvidas no "rolamento" de afinidade relativamente baixa, dos linfócitos ao longo do endotélio, durante as respostas inflamatórias (Lawrence, M.B. *et al.* Cell 65, 859-873 (1991); Ley, K. *et al.* Blood 77 (12), 2553-2555 (1991); Von Andrian, V. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1538-1542 (1991)].

Os pormenores moleculares das interacções entre os domínios de lectina da selectina e os seus ligandos de hidratos de carbono são pouco compreendidos. O facto de todas as três selectinas necessitarem de ácido siálico para a adesão, conjuntamente com a verificação de que alguns polímeros de hidratos de carbono carregados negativamente, como a fucoidina, sulfato de dextrano e éster de polifosfomanano, são inibidores eficazes de alguma adesão celular mediada pela selectina, é consistente com o envolvimento de aminoácidos carregados positivamente no reconhecimento de hidratos de carbono. No entanto, o facto de essas interacções proteína-ácido siálico poderem ser também conseguidas por cadeias laterais não carregadas, é sugerido por análise cristalográfica da interacção de baixa-afinidade entre a glicoproteína hemaglutinina de influenza, que não está relacionada com as lectinas do tipo C, com o seu ligando de superfície, o ácido siálico, o que revelou que esta interacção envolve uma diversidade de cadeias laterais de aminoácidos, não sendo nenhuma delas carregada positivamente [Weis, W *et al.*, Science 254, 1608-1615 (1985)]. O facto de uma simples face ou bolsa do domínio de lectina da E- e potencialmente da P-selectina [Polley, M. J. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USa 88, 6224-6228 (1991)] estar envolvido no reconhecimento de sLex é sugerido por análises de RMN em solução da estrutura de sLex, o que demonstra que os resíduos de ácido siálico e fucose críticos apontam, ambos, para uma face deste ligando de hidrato de carbono e estão separados por ~10 angstrom, enquanto que a forma inactiva deste hidrato de carbono (com um ácido siálico ligado em 2-6), tem estes dois componentes funcionais importantes a apontar em posições muito diferentes. Uma análise estrutural semelhante de outro ligando da E-selectina, o sialilo Lewis a (sLea: ácido siálico alfa 2-3 galactose beta 1-3 N-acetil glucosamina (Fucose alfa 1-4)), revelou que os resíduos de ácido siálico e fucose críticos apontam, mais uma vez, para uma face do tetrassacárido e estão

separados aproximadamente pela mesma distância que em sLex. Veja-se Berg., E.L. *et al.* J. Biol. Chem. 265, 14869-72 (1991); Tyrrell, D. *et al.* (1991), supra.

Um objecto do presente invento é identificar a(s) região(ões) na sequência de aminoácidos dos domínios de lectina da selectina que é(são) crítico(s) para a interacção entre os receptores de selectina e os seus ligandos.

Constitui outro objecto do invento permitir a preparação de variantes da sequência de aminoácidos de selectinas, com propriedades de ligação ao ligando melhoradas, em particular maior afinidade para os respectivos ligandos, comparado com os receptores de selectina nativos correspondentes.

Um outro objecto é identificar sequências de domínios de lectina da selectina que não são críticos para a interacção das selectinas e seus ligandos respectivos.

Constitui um outro objecto do invento proporcionar variantes de sequências de aminoácidos de selectina com características farmacológicas melhoradas, *e.g.* maior estabilidade física e/ou química, maior semi-vida, menor taxa de eliminação in vivo, menor gravidade ou ocorrência de efeitos laterais durante a utilização terapêutica, etc., tendo uma afinidade de ligação ao ligando mantida ou aumentada, quando comparados com a selectina nativa correspondente.

As variantes de selectina com propriedades de ligação ao ligando melhoradas têm um potencial terapêutico elevado como inibidores eficazes de respostas inflamatórias patológicas mediadas por selectinas, por bloqueamento da interacção selectina-ligando de selectina.

Estes e outros objectos do presente invento serão evidentes para o perito na arte.

Sumário do invento

As interacções adesivas entre sLex e os domínios de lectina da selectina foram analisados de acordo com duas estratégias. Na primeira, produziram-se domínios de lectina da selectina quiméricos, humano-coelho, com base nas diferenças entre as sequências de aminoácidos das duas espécies. Estas quimeras têm sido utilizadas para fazer o mapeamento de epítopos reconhecidos por anticorpos monoclonais bloqueadores de selectina anti-humanos (Mabs). Na segunda, produziram-se mutações pontuais na selectina e analisaram-se quanto à ligação a um painel de Mabs anti-selectina, bloqueadores e não

bloqueadores, e quanto à sua capacidade de aderir ao glicolípido sLex imobilizado. Os resíduos que afectam vários aspectos da estrutura e/ou função da selectina foram então sobrepostos num modelo tridimensional dos domínios de lectina da selectina, que foi produzido utilizando as coordenadas estruturais determinadas para uma lectina tipo C relacionada, a proteína de ligação à manose [Weiss, W. *et al.* Science 254 1608-1615 (1991)]. Em conjunto, estes dados definem uma região relativamente pequena no domínio de lectina da selectina, que é crítica para o reconhecimento do ligando de hidratos de carbono, o sLex.

Verificou-se que os principais resíduos de aminoácidos de selectina primeiramente envolvidos no reconhecimento de hidratos de carbono estão num retalho na superfície do domínio de lectina, próximo da folha beta anti-paralela, formada por terminais N e C ligados por dissulfureto e a dobra de dissulfureto conformacionalmente adjacente, formada pelas duas cisteínas internas. Deste modo, o sLex é aparentemente reconhecido por uma região relativamente pequena do domínio de lectina da selectina, compreendido por resíduos dos terminais N e C e pela pequena dobra ligada por dissulfureto.

Verificou-se ainda que as cadeias laterais de aminoácidos carregados positivamente têm uma papel essencial no reconhecimento de ligandos de hidratos de carbono das selectinas.

Verificou-se também que a substituição de resíduos de aminoácidos carregados por resíduos não carregados na região de terminal-N das selectinas aumenta a afinidade de ligação das selectinas aos seus respectivos ligandos de hidratos de carbono.

Num aspecto, o presente invento proporciona uma variante de E-, L- ou P-selectina humana diferente de uma selectina nativa, com uma substituição de aminoácidos numa ou mais das posições de aminoácidos 7-9, 43-48, 94-100, 111 e 113 da selectina humana nativa, correspondente.

Numa forma de concretização preferida, a alteração de aminoácidos ocorre num local ou locais dentro de um retalho que compreende aminoácidos na superfície do domínio de lectina, próximo da fita beta anti-paralela, formada por terminais N e C ligados por dissulfureto, do domínio de lectina e os aminoácidos da dobra de dissulfureto adjacente, formada pelas duas cisteínas internas do domínio de lectina.

Numa forma de concretização particularmente preferida, a alteração de aminoácidos ocorre dentro do retalho definido pelos resíduos de aminoácidos números 1-9, e 90 do terminal C do domínio de lectina da selectina nativa correspondente.

Numa outra forma de concretização preferida, as alterações de aminoácidos ocorrem dentro do retalho tridimensional, definido pelos resíduos de aminoácidos números 7-9, 90-109 e 113 do domínio de lectina da selectina nativa correspondente.

Numa forma de concretização ainda mais preferida, a alteração ocorre numa ou mais das posições de aminoácidos 7-9, 43-48, 94-100 e 113 da selectina humana nativa correspondente.

Numa outra forma de concretização preferida, a alteração de aminoácidos ocorre nos resíduos de aminoácido número 7-9, e mais preferencialmente no resíduo de aminoácido número 8.

Em todos os casos, a alteração de aminoácidos é, de preferência, uma substituição.

Numa forma de concretização particularmente preferida, a alteração de aminoácidos é a substituição de um aminoácido não carregado pequeno, por um aminoácido carregado, no resíduo de aminoácido número 8, do domínio de lectina da selectina nativa correspondente.

As variantes possuem de preferência um aminoácido carregado positivamente, em pelo menos uma das posições de aminoácidos 97, 111 e 113 do domínio de lectina da selectina nativa correspondente.

Ainda noutras formas de concretização preferidas, as variantes da sequência de aminoácidos de selectina retêm o domínio do tipo egf de uma selectina correspondente.

Noutras formas de concretização, o presente invento refere-se a uma sequência de ácidos nucleicos que codifica para a variante de selectina acima descrita, vectores de expressão replicáveis, que compreendem e são capazes de expressar a sequência de ácidos nucleicos numa célula hospedeira transformada, e culturas de microorganismos e células transformadas com o vector.

Ainda noutra forma de concretização, o invento proporciona um método que compreende:

(a) introdução de uma substituição de aminoácidos no retalho tridimensional definido pelo resíduo de aminoácido número 7-9, 90-109 e 113 do domínio de lectina de uma L-, E- ou P-selectina humana nativa; e

(b) pesquisa da variante de selectina resultante, quanto a uma maior afinidade para um ligando nativo da selectina nativa correspondente.

As variantes de selectina do presente invento com uma afinidade de ligação aumentada para os seus ligandos nativos correspondentes podem ser utilizadas para bloquear a ligação de uma selectina nativa correspondente ao seu ligando e, deste modo, são úteis como inibidores de respostas inflamatórias patológicas mediadas por selectinas. Por exemplo, estas variantes de L-selectina (agonistas de L-selectina) bloqueiam eficazmente a ligação da L-selectina num leucócito circulante ao seu ligando nativo, numa célula endotelial. Esta propriedade é útil para tratar um sintoma, ou condição, associados com a ligação excessiva de leucócitos circulantes a células endoteliais, tal como a inflamação associada com a artrite reumatóide, psoríase, esclerose múltipla, etc.

Deste modo, o presente invento proporciona também a utilização das variantes de selectina acima mencionadas na preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de um sintoma ou condição, associados com uma resposta inflamatória patológica mediada por uma selectina.

As variantes de selectina do presente invento podem ser formuladas de acordo com métodos conhecidos para preparar composições farmaceuticamente úteis, em que a variante é combinada, em mistura, com um veículo farmaceuticamente aceitável. Estas composições farmacêuticas estão dentro do âmbito do presente invento.

O presente invento refere-se ainda a proteínas quiméricas que compreendem uma fusão de uma sequência de aminoácidos que compreende uma sequência do domínio de lectina da selectina com uma alteração, como acima descrito (de preferência em conjunto com um domínio do tipo egf e sequências curtas de repetição de consenso (SCR)), a uma sequência de domínio constante de uma imunoglobulina.

As variantes de selectina com afinidade reduzida para o seu ligando nativo são úteis em testes de pesquisa de substâncias (*e.g.* péptidos, componentes de caldos de fermentação, derivados de hidratos de carbono e semelhantes) capazes de bloquear ou aumentar a ligação da selectina com o seu ligando. Numa forma de concretização, determina-se a capacidade da substância a ser testada se ligar à selectina variante. Se esta for substancialmente incapaz de

se ligar à selectina variante e ao ligando, mas não afectar a ligação da selectina nativa ao seu ligando, então pode-se concluir que interage com a selectina em resíduos instrumentais na ligação ao ligando. Estas substâncias são de interesse particular como antagonistas da ligação selectina-ligando.

Descrição sumária das figuras

Figura 1. Caracterização de anticorpos monoclonais anti-E-selectina. (A) Inibição da adesão de células HL60 a HUVECS activado por citóquinas (barras a cheio) e células COS transfectadas com E-selectina (barras às riscas), por anticorpos monoclonais anti-E-selectina. As células foram pré-incubadas com MAb's (10 μg/ml) durante 1 h à temperatura ambiente e a adesão de células HL60 foi determinada como descrito na secção de procedimentos experimentais do Exemplo 1. Cada barra representa a média +/- DP de determinações em triplicado, expressas como uma percentagem da ligação do controlo. (B) ligação de MAb's anti-E-selectina a E-selectina humana (barras a cheio) e de coelho (barras às riscas). Os anticorpos (10 μg/ml) foram incubados durante 1 h à temperatura ambiente em placas de microtítulo de 96 poços, aos quais foi anteriormente ligada E-selectina humana ou de coelho, recombinante. Os poços foram lavados e incubados com peroxidase de rábano ligada a IgG de cabra anti-ratinho, lavados e desenvolvidos utilizando protocolos convencionais.

Figura 2. Construções de E-selectina. (A) Alinhamento de aminoácidos dos domínios de lectina de E-selectina humana e de coelho, começando no terminal-N putativo do polipéptido maduro. São apresentadas as substituições de aminoácidos no péptido de coelho, sendo todas as outras posições idênticas às dos resíduos humanos. (B) Construções de E-selectina utilizadas para mapear locais de ligação de Mabs e sLex. A 2-selectina humana continha os aminoácidos 1-157, os aminoácidos codificados dė E-selectina de coelho, 1-156, e a HuRa-1 continha os resíduos 1-9 humanos contíguos aos resíduos 10-156 de E-selectina de coelho. Cada um está ancorado à superfície celular através de uma ligação GPI, codificada por sequências CD16. Também é apresentada uma quimera E-selectina-IgG (E Sel-IgG) contendo lectina, domínios do tipo egf e do tipo ligação ao complemento (CBD) 1 e 2 da E-selectina humana ligada às juntas, CH2 e CH3 da IgG 1 humana [Watson *et al.*, J. Cell Biol. 115, 235-243 (1990)]

Figura 3. Ligação de anticorpos bloqueadores à quimera HuRa-1. Localização por imunofluorescência da ligação de anticorpos anti-E-selectina a células COS transfectadas com lectina de E-selectina humana-egf-CD16 (coluna 1), lectina de E-selectina de coelho-egf CD16 (coluna 2) e HuRa-1, lectina de E-selectina quimérica humana-coelho-egf

CD15 (coluna 3). As células transfectadas foram fixadas e coradas com Mabs anti-E-selectina 3B7 (linha 1), 7H5 (linha 2), 8E4 (linha 3) ou 14G2 (linha 4).

Figura 4. Ligação de HL60 a HuRa-1 na presença de anticorpos bloqueadores. Inibição da ligação de HL60 a células COS transfectadas com lec de E-selectina humana-egf-CD16 (barras a cheio), lec de E-selectina de coelho-egf-CD16 (barras abertas) e HuRa-1 lectina de E-selectina quimérica humano-coelho-egf-CD16 (barras às riscas), por Mabs anti-E-selectina bloqueadores. As células foram pré-incubadas com 3B7, 7H5, 8E4 ou 14G2 (10 μg/ml) durante 1 h e a adesão de células HL60 foi determinada como descrito na secção de procedimentos experimentais do Exemplo 1. Cada barra representa a média +/- DP de determinações em triplicado.

Figura 5. Reactividade de MAbs anti-E-selectina com quimeras mutantes. As quimeras de E-selectina-IgG com as mutações apresentadas foram testadas quanto à captura por cada um dos quinze MAbs anti-E-selectina, utilizando o formato de ELISA descrito na secção de procedimentos experimentais do Exemplo 1. Os resultados apresentados representam a média +/- DP de determinações em duplicado e são expressas como uma percentagem da ligação controlo ou do tipo selvagem.

Figura 6. Ligação de mutantes Scan de alanina ao glicolípido sLex imobilizado. (A) Quimeras de E-selectina-IgG em que os resíduos indicados foram mutados para alanina e foram testados quanto à ligação ao glicolípido 2,3 sLex, imobilizado pelo processo ELISA descrito na secção de procedimentos experimentais do exemplo 1. Os resultados apresentados representam a média +/- D.P. de determinações em triplicado, expressas como uma percentagem da ligação controlo ou do tipo selvagem. (B) Testou-se o mutante E8A de E-selectina-IgG (quadrados abertos) ou a E-selectina-IgG do tipo selvagem (quadrados fechados) nas concentrações indicadas, quanto à ligação ao glicolípido 2,3 sLex imobilizado, pelo ELISA acima descrito. Os resultados apresentados representam a média +/- D.P. de determinações em triplicado.

Figura 7. Modelo do domínio de lectina da E-selectina. É apresentado um modelo de fitas do domínio de lectina da E-selectina derivado a partir das coordenadas publicadas da lectina tipo C relacionada, a proteína de ligação à manose [Weis *et al.* Science 254, 1608-1615 (1991)]. A orientação A mostra os resíduos de aminoácido cuja mutação não afectou a ligação de sLex ou de Mab (castanho), o resíduo na posição 74 cuja mutação não afectou a ligação de sLex, mas afectou a ligação de vários Mab não bloqueadores (rosa), os resíduos nas posições 7,9 e 98, cuja mutação aboliu a ligação do Mab bloqueador (vermelho), os resíduos nas posições 97,99 e 113, cujas mutações aboliram a ligação de sLex

(amarelo) e o resíduo na posição 8, cuja mutação aumentou a afinidade da E-selectina para sLex (verde). Tal como referido a seguir, a mutação nos resíduos 8 e 113 também afectou a ligação de alguns Mabs bloqueadores. O único cálcio ligado é apresentado como uma bola verde. Também se mostra na orientação A a estrutura de sLex em solução [Tyrrell *et al.*, Proc. Natl. Acad Sci. USA 88, 10372-10376 (1991); Berg *et al.*, J. Biol. Chem. 265, 14869-14872 (1991)]. A dobra púrpura escuro (resíduos S43-Y48) e a dobra azul escuro (resíduos Y94-D100) denotam duas dobras próximas do local de ligação do hidrato de carbono de E-selectina, que não se encontram na proteína de ligação à manose. A orientação B mostra o "local activo" da ligação de hidratos de carbono numa vista frontal, estando os resíduos envolvidos no reconhecimento do hidrato de carbono e/ou ligação a Mab bloqueador, coloridos como para a orientação A.

Figura 8. Ligação do mutante K8A de L-selectina-IgG a sLex imobilizado. Testou-se o mutante K8A de L-selectina-IgG (quadrados abertos) ou a L-selectina-IgG do tipo selvagem (quadrados fechados) nas concentrações indicadas, quanto à ligação ao glicolípido 2,3 sLex imobilizado, por ELISA, como acima descrito. Os resultados apresentados representam a média +/- D.P. de determinações em triplicado.

Figura 9. Estruturas de membros da família de selectinas (LEC-CAM), determinadas por clonagem de ADNc. Estão ilustradas as estruturas da L-selectina, E-selectina e P-selectina. A lectina, factor de crescimento epidérmico (EGF) e repetições de consenso curtas, múltiplas (SCRs) são apresentadas com estruturas de ligações dissulfureto hipotéticas, como primeiro proposto para o GMP-140 por Johnston *et al.* Cell 56, 1033 (1989). Também se apresenta uma sequência N-terminal (subsequentemente clivada na proteína madura), bem como uma âncora hidrófoba transmembranar (TM) e cauda citoplásmica. Também estão ilustradas duas outras formas de P-selectina, uma com um domínio scr-7 eliminado e outra com uma âncora que atravessa a membrana eliminada.

Figura 10. Coloração de células HL-60 e neutrófilos por quimeras de selectina-IgG. Testaram-se as quimeras de selectina-IgG por citometria de fluxo, quanto à coloração, ou de células HL60 (A e C) ou de neutrófilos humanos (B e D), como descrito no Exemplo 3. Em (A) e (B), as linhas a cheio representam a coloração de P-selectina-IgG, as linhas a ponteado representam a coloração de P-selectina-IgG na presença de EGTA 10 mM e as linhas a tracejado representam a coloração de E-selectina-IgG. A coloração sem quimeras (apenas anticorpo secundário) era idêntica à coloração de E-selectina-IgG, para ambos os tipos de células. (C) As células HL60 foram tratadas como indicado no Exemplo 3 e coradas com P-selectina-IgG, como em (A). Os resultados são expressos como a percentagem de células que coram positivamente (+/- DP de duplicados), com base na coloração apenas com

anticorpo secundário. (D) Os neutrófilos humanos antes (barras a cheio), ou depois (barras abertas) de activação com PMA foram corados com os reagentes indicados e avaliados por citometria de fluxo, como descrito no Exemplo 3. Os resultados são apresentados como fluorescência média linear.

Figura 11. Ligação da quimera PE-1 a glicolípidos sLex e sulfatidos imobilizados. Testou-se a P-selectina-IgG (círculos abertos), E-selectina-IgG (quadrados abertos) ou PE-1 (círculos fechados) nas concentrações indicadas, quanto à ligação ao glicolípido 2'3 sLex (A), glicolípido 2'6 sLex (B), ou sulfatidos (C), imobilizados, pelo processo ELISA descrito no Exemplo 3. Os resultados apresentados mostram a média +/- DP de determinações em triplicado.

Figura 12. Coloração de células HL60 com quimera PE-1. As quimeras P-selectina-IgG, E-selectina-IgG e PE-1 foram testadas quanto à ligação a células HL60 por citometria de fluxo, como na Figura 10. É indicada a percentagem de células que coram positivamente (com base na coloração apenas com o anticorpo secundário) com cada quimera.

Figura 13. Captura de anticorpos e ligação a 2'3 sLex de NB2D E-selectina. A NB2D E-selectina foi produzida e testada como descrito no Exemplo 1. (a) captura de anticorpo; (B) ligação a 2'3 sLex; (C) ligação a 2'3 sLex na presença de cálcio adicionado.

Figura 14. Reactividade da mAb's anti-P-selectina com quimeras mutantes. As quimeras P-selectina-IgG com as substituições indicadas foram testadas quanto à captura pelo mAb AK-6 (barras a cheio), AC 1,2 (barras abertas) e CRC 81 (barras às riscas), como na tabela 1. Os resultados apresentados representam a média +/- D.P. de determinações em duplicado e são expressos como percentagem da ligação de P-selectina-IgG controlo.

Figura 15. Ligação de mutantes de P-selectina-IgG a glicolípidos imobilizados e células. Testaram-se as quimeras de P-selectina-IgG com as substituições indicadas, quanto à ligação ao glicolípido 2'3 sLex imobilizado (A), glicolípido 2'6 sLex (B), ou sulfatidos (C), como na Figura 11 e quanto a coloração de células HL60 (D), como na Figura 10.

Descrição pormenorizada do invento

I. *Definições*

O termo "selectina" é utilizado para designar uma molécula de adesão celular que possui, na sua região extracelular, um domínio de lectina, um domínio do tipo egf e domínios do tipo ligação ao complemento e com a capacidade qualitativa de mediar a ligação celular, através da interacção com um ligando de hidrato de carbono de superfície, mas que pode ter, no entanto, menos ou mais domínios se continuar a funcionar como um mediador da adesão celular. A definição inclui especificamente moléculas de selectina "solúveis" sem um domínio transmembranar funcional, bem como variantes de sequências de aminoácidos e de glicosilação e modificações covalentes de uma selectina nativa.

A expressão "selectina nativa" é utilizada para definir uma molécula de selectina nativa de qualquer espécie animal humana ou não humana, incluindo as variações alélicas que ocorrem naturalmente, que podem ocorrer de indivíduo para indivíduo, demonstradas por uma diferença(s) na sequência total, sem qualquer limitação quanto ao seu modo de preparação. Assim, a selectina nativa pode ser obtida a partir de qualquer fonte nativa, pode ser produzida sinteticamente ou por tecnologia de ADN recombinante, ou por combinação adequada destes métodos. O termo inclui especificamente selectinas nativas de mamífero, e.g. humanos e E-, L- e P-selectinas.

A expressão "selectina correspondente" tal como utilizada ao longo da descrição e reivindicações refere-se a uma molécula de selectina com um domínio de lectina de selectina nativa não alterado que pode, no entanto, ter alterações noutras partes das moléculas, de acordo com a definição anterior de "selectina". Assim, por exemplo, para variantes de E-selectina, a selectina correspondente tem uma sequência nativa (inalterada) do domínio de lectina da E-selectina de qualquer espécie animal, mas pode, de outro modo, diferir das E-selectinas que ocorrem naturalmente.

Nas reivindicações e ao longo da descrição, algumas alterações são definidas com referência ao número de resíduos de aminoácidos do domínio de lectina da selectina humana nativa correspondente. A numeração de aminoácidos começa no primeiro aminoácido do terminal-N do domínio de lectina de uma sequência de aminoácidos de E-, L- ou P-selectina humana nativa. A sequência de aminoácidos do domínio de lectina da E-selectina humana nativa é apresentada na Figura 2(A) (aminoácidos 1-120). O domínio de lectina da L-selectina humana nativa, compreende resíduos de aminoácidos designados pelos números 39-155 na Figura 1 da Patente U.S. Nº 5,098,833 publicada em 24 de Março de 1992.

Seguindo a numeração de sequência aqui aplicada, estes resíduos são referidos como os resíduos de aminoácido números 1-117. A sequência de aminoácidos do domínio de lectina da P-selectina é, por exemplo, apresentado na Figura 2 de Lasky, L.A., J. Cell Biochem. 45, 139-146 (1991). Esta última publicação também mostra as homologias de sequência relativas dos domínios de lectina das três selectinas.

Os termos "aminoácido" e "aminoácidos" referem-se a todos os L-α-aminoácidos que ocorrem naturalmente. Esta definição pretende incluir a norleucina, ornitina e homocisteína. Os aminoácidos são identificados quer pelas designações de uma letra, quer pelas de três letras:

Asp	D	ácido aspártico	Ile	I	isoleucina
Thr	T	treonina	Leu	L	leucina
Ser	S	serina	Tyr	Y	tirosina
Glu	E	ácido glutâmico	Phe	F	fenilalanina
Pro	P	prolina	His	H	histidina
Gly	C	glicina	Lys	K	lisina
Ala	A	alanina	Arg	R	arginina
Cys	C	cisteína	Trp	W	triptofano
Val	V	valina	Gln	Q	glutamina
Met	M	metionina	Asn	N	asparagina

Estes aminoácidos podem ser classificados de acordo com a composição química e propriedades das suas cadeias laterais. São classificados em dois grandes grupos, carregados e não carregados. Cada um destes grupos é dividido em subgrupos para classificar os aminoácidos de um modo mais preciso:

I. Aminoácidos carregados
Resíduos acídicos: ácido aspártico, ácido glutâmico
Resíduos básicos: lisina, arginina, histidina

II. Aminoácidos não carregados
Resíduos hidrófilos: serina, treonina, asparagina, glutamina
Resíduos alifáticos: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina
Resíduos não polares: cisteína, metionina, prolina
Resíduos aromáticos: fenilalanina, tirosina, triptofano

Os termos "alterações de aminoácidos" e "alteração" referem-se a substituições, eliminações ou inserções de aminoácidos ou quaisquer combinações destes, numa sequência de aminoácidos de selectina. Nas variantes de selectina do presente invento, esta alteração ocorre num local, ou locais, de uma sequência de aminoácidos do domínio de lectina de selectina.

As variantes de substituição são as que têm pelo menos um resíduo de aminoácido numa sequência do domínio de lectina da selectina nativa removido e um aminoácido diferente inserido no seu lugar, na mesma posição. As substituições podem ser simples, em que apenas um aminoácido na molécula foi substituído, ou podem ser múltiplas, em que dois ou mais aminoácidos foram substituídos na mesma molécula.

As variantes de inserção são as que têm um ou mais aminoácidos inseridos imediatamente adjacentes a um aminoácido numa posição particular numa sequência do domínio de lectina da selectina nativa. Imediatamente adjacente a um aminoácido significa ligado ou a um grupo funcional α-carboxi, ou α-amino do aminoácido. A inserção pode ser de um ou mais aminoácidos. Vulgarmente, a inserção irá consistir de um ou dois aminoácidos conservativos. Os aminoácidos semelhantes em carga e/ou estrutura aos aminoácidos adjacentes ao local de inserção são definidos como conservativos. Alternativamente, o presente invento inclui a inserção de um aminoácido com uma carga e/ou estrutura que é substancialmente diferente dos aminoácidos adjacentes ao local de inserção.

As variantes de eliminação são as que têm um ou mais aminoácidos removidos na sequência de aminoácidos do domínio de lectina da selectina nativa. Vulgarmente, as variantes de eliminação terão um ou dois aminoácidos eliminados numa região particular da sequência de aminoácidos do domínio de lectina.

A designação das variantes de substituição consiste aqui de uma letra seguida de um número, seguida de uma letra. A primeira letra (mais à esquerda) designa o aminoácido no domínio de lectina da selectina nativa (inalterado). O número refere-se à posição de aminoácido em que a substituição de aminoácidos está a ser feita e a segunda letra (do lado direito) designa o aminoácido que é utilizado para substituir o aminoácido nativo. A designação de uma variante de inserção consiste da letra "i" seguida de um número que designa a posição do resíduo numa sequência de aminoácidos de selectina nativa, antes da qual começa a inserção, seguido de uma ou mais letras maiúsculas, que indicam, inclusivamente, a inserção a ser feita. A designação de uma variante de eliminação consiste da letra "d" seguida pelo número da posição de início da eliminação até ao número da

posição final da eliminação, em que as posições se baseiam na sequência de aminoácidos da sequência nativa, do domínio de lectina não alterado da selectina correspondente (E, L ou P). Tal como anteriormente mencionado, a numeração começa na sequência de aminoácidos do terminal-N do domínio de lectina da selectina (que é a extremidade N-terminal da molécula de selectina nativa, madura). As alterações múltiplas são separadas por uma vírgula (,) na notação, para facilidade de leitura.

Os termos "molécula de ácido nucleico codificante", "sequência de ADN codificante" e "ADN codificante" referem-se à ordem ou sequência de desoxiribonucleótidos ao longo da cadeia de ácido nucleico. A ordem destes desoxiribonucleótidos determina a ordem de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica. A sequência de ADN codifica assim para a sequência de aminoácidos.

Um ácido nucleico está "ligado de forma operacional" quando é colocado numa relação funcional com outra sequência de ácidos nucleicos. Por exemplo, o ADN para uma pré-sequência ou líder secretor está ligado de forma operacional a um ADN que codifica para um polipéptido, quando é expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipéptido; um promotor ou potenciador está ligado de forma operacional a uma sequência codificante, quando afecta a transcrição da sequência; ou um local de ligação a um ribossoma está ligado de forma operacional a uma sequência codificante, quando está posicionado de modo a facilitar a tradução. Em geral, "ligado de forma operacional" significa que as sequências de ADN a ser ligadas são contíguas e, no caso de um líder secretor, contíguas e em fase de leitura. No entanto, os potenciadores não têm que ser contíguos. A ligação é conseguida por ligação em locais de restrição convenientes. Se estes locais não existem, então utilizam-se adaptadores de oligonucleótidos sintéticos ou ligantes, de acordo com a prática convencional.

Os termos "vector de expressão replicável" e "vector de expressão" referem-se a uma porção de ADN, normalmente de cadeia dupla que pode ter nela inserida uma porção de ADN estranho. O ADN estranho é definido como ADN heterólogo, que é ADN que não se encontra naturalmente na célula hospedeira. O vector é utilizado para transportar o ADN estranho ou heterólogo até uma célula hospedeira adequada. Uma vez na célula hospedeira, o vector pode-se replicar independentemente do ADN cromossomal do hospedeiro e podem-se produzir várias cópias do vector e do seu ADN inserido (estranho). Além disso, o vector contém os elementos necessários que permitem a tradução do ADN estranho num polipéptido. Podem assim sintetizar-se rapidamente muitas moléculas do polipéptido codificado pelo ADN estranho.

No contexto do presente invento, a expressão "célula", "linha celular" e "cultura de células" são utilizadas de forma intercambiável e todas as designações incluem a descendência. Deve também entender-se que toda a descendência pode não ter precisamente o mesmo conteúdo de ADN, devido a mutações deliberadas ou inadvertidas. Incluem-se os descendentes mutantes que têm a mesma função ou propriedade biológica pesquisada na célula originalmente transformada.

"Transformação" significa introduzir ADN num organismo de modo a que o seu ADN seja replicável, quer como um elemento extracromossómico, quer por integração cromossómica.

"Transfecção" refere-se à incorporação de um vector de expressão por uma célula hospedeira, quer sejam ou não expressas, de facto, quaisquer sequências codificantes.

Os termos "célula hospedeira transformada" e "transformada" referem-se à introdução de ADN numa célula. A célula é designada por "célula hospedeira" e pode ser uma célula procariótica ou eucariótica. As células hospedeiras procarióticas típicas incluem várias estirpes de E. coli. As células hospedeiras eucarióticas típicas são de mamífero, tal como as células de ovário de hamster Chinês, ou as células de rim embriónico humano, 293. O ADN introduzido é geralmente na forma de um vector que contém uma porção de ADN inserido. A sequência de ADN introduzida pode ser da mesma espécie que a célula hospedeira, ou de uma espécie diferente da célula hospedeira, ou pode ser uma sequência de ADN híbrida, contendo algum ADN estranho e algum ADN homólogo.

Os "oligonucleótidos" são polidesoxinucleótidos de cadeia simples ou dupla, de pequeno comprimento, que são sintetizados quimicamente por métodos conhecidos, tais como a química do fosfotriéster, fosfite ou fosforamidite, utilizando técnicas de fase sólida, como as descritas em EP 266032, publicada em 4 de Maio de 1988, ou através de intermediários de desoxinucleósido-H-fosfanato, tal como descrito por Frohler *et al.* Nucl. Acids. Res 14, 5399 (19869]. São em seguida purificados em geles de poliacrilamida.

A técnica da "reacção em cadeia com polimerase" ou "PCR", tal como aqui utilizada, refere-se, em geral, a um processo em que se amplificam quantidades diminutas de uma porção específica de um ácido nucleico, ARN e/ou ADN, como descrito na Patente U.S. Nº 4,683,195 concedida em 28 Julho de 1987 e em Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.* eds, Greene Publishing Associates e Wiley-Interscience 1991, volume 2, capítulo 15.

O termo "anticorpo monoclonal", tal como aqui utilizado, refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogéneos, *i.e.* os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, excepto no que respeita a possíveis mutações que ocorrem naturalmente, que podem estar presentes em quantidades menores. Assim, o modificador "monoclonal" indica que o carácter do anticorpo não é uma mistura de anticorpos discretos. Os anticorpos monoclonais incluem anticorpos híbridos e recombinantes, produzidos por ligação de um domínio variável (incluindo hipervariável) de um anticorpo ligando anti-selectina com um domínio constante (*e.g.* anticorpos "humanizados"), sendo apenas um dirigido contra a selectina, ou uma cadeia leve com uma cadeia pesada, ou uma cadeia de uma espécie com uma cadeia de outra espécie, ou fusões com proteínas heterólogas, independentemente da espécie de origem, ou da designação de classe ou subclasse de imunoglobulina, bem como fragmentos de anticorpo (*e.g.* Fab, $F(ab')_2$ e Fv). Cabilly *et al.*, Pat. U.S. Nº 4,816,567; Mage & Lamoyi, em Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp 79-97 (Marcel Dekker, Inc. Nova Iorque, 1987). Assim, o modificador "monoclonal" indica que o carácter do anticorpo, é obtido a partir desta população substancialmente homogénea de anticorpos e deve entender-se que não é necessária a produção do anticorpo por qualquer método particular.

A expressão "anticorpo monoclonal bloqueador" é utilizada para referir anticorpos monoclonais capazes de inibir a ligação de uma variante de selectina do presente invento a um ligando nativo da selectina correspondente (E, L ou P), num teste de ligação convencional, tal como o teste descrito no exemplo 1.

O termo "imunoglobulina" refere-se em geral a polipéptidos que compreendem uma cadeia leve ou pesada, estando ambas normalmente ligadas por ligações dissulfureto na configuração em "Y" nativa, embora também estejam neste âmbito outras ligações entre elas, incluindo tetrameros ou agregados seus derivados.

As imunoglobulinas (Ig) e algumas variantes suas derivadas, são conhecidas e podem ser preparadas em cultura de células recombinantes. Por exemplo, veja-se a patente U.S. 4,745,055; EP 256,654; Faulkner *et al.* Nature 298: 286 (1982); EP 120,694; EP 125,023; Morrison, J. Immun. 123: 793 (1979); Köhler *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197 (1580), Raso *et al.*, Cancer Res. 41: 2073 (1981); Morrison *et al.* Ann. Rev. Immunol. 2: 239 (1984); Morrison, Science 229: 1202 (1985); Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851 (1984); EP 255,694; EP 266,663 e WO 88/03559. Também são conhecidas cadeias de imunoglobulina redistribuídas. Veja-se por exemplo, patente U.S. 4,444,878, WO 88/03565 e EP 68,763 e as referências nelas citadas. As quimeras de L-selectina-imunoglobulina são descritas, por exemplo, em WO 91/08298, publicada a 13 de Junho 1991. A produção e

caracterização de quimeras de E-selectina-imunoglobulina estão descritas em Foxall *et al.* J. Cell Biol. 1992, em impressão. As quimeras de P-selectina-imunoglobulina foram construídas de um modo análogo. A porção de imunoglobulina na quimera do presente invento pode ser obtida a partir dos subtipos IgG_1, IgG_2, IgG_3 ou IgG_4, IgA, IgE, IgD ou IgM, mas de preferência IgG_1 ou IgG_3.

II. Construção das variantes de selectina e dos seus derivados por mutagénese direccionada para o local

A preparação de variantes de selectina de acordo com o invento é realizada de preferência por mutagénese específica do local, do ADN que codifica para uma versão variante ou não variante da proteína, anteriormente preparada. A mutagénese específica do local permite a produção de variantes de selectina através da utilização de sequências de oligonucleótidos específicas, que codificam para a sequência de ADN da mutação desejada, bem como um número suficiente de nucleótidos adjacentes, para proporcionar uma sequência iniciadora de síntese de tamanho e complexidade de sequência suficientes para formar uma dupla cadeia estável, em ambos os lados da junção a ser tratada. Tipicamente, prefere-se um iniciador de síntese com cerca de 20 a 25 nucleótidos de comprimento, com cerca de 5 a 10 resíduos, em ambos os lados da junção da sequência a ser alterada. Em geral, a técnica de mutagénese específica do local é bem conhecida na arte, como exemplificado pelas publicações de Adelman *et al.* ADN 2: 183 (1983).

Como será reconhecido, a técnica de mutagénese específica do local utiliza tipicamente um vector fago que existe tanto na forma de cadeia simples, como de cadeia dupla. Os vectores típicos, úteis na mutagénese direccionada para o local incluem vectores como o fago M13, por exemplo, como descrito por Messing *et al.*, Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA, Editor A. Walton, Elsevier, Amesterdão (1981). Este fago pode ser facilmente adquirido comercialmente e a sua utilização é geralmente bem conhecida dos peritos na arte. Alternativamente, podem-se utilizar os vectores plasmídeo que contêm um fago de cadeia simples como origem de replicação (Veira *et al.*, Meth. Enzymol., 153: 3 (1987), para obter ADN de cadeia simples.

O método de mutagénese específica utilizado na produção das variantes de E-selectina do exemplo 1, foi descrito por Kunkel *et al.*, Methods in Enzymol 154 367-382 (1987).

Em geral, a mutagénese direccionada para o local pode ser realizada, por exemplo, obtendo primeiro um vector de cadeia simples, que inclui na sua sequência uma sequência de

ADN que codifica para a selectina relevante. Prepara-se um iniciador de síntese de oligonucleótidos com a sequência mutada desejada, geralmente de um modo sintético, por exemplo, pelo método de Crea *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci (USA) 75: 5765 (1978). Este iniciador de síntese é então fundido com o vector que contém a sequência de selectina de cadeia simples e submetido a enzimas de polimerização de ADN, tal como o fragmento Klenow de polimerase I de *E. coli*, para completar a síntese da cadeia que possui a mutação. Forma-se assim um heteroduplex, em que uma cadeia codifica para a sequência original, não mutada e a segunda cadeia transporta a mutação desejada. Este vector heteroduplex é então utilizado para transformar células adequadas, tais como as células JM101 e seleccionam-se os clones, por hibridação com uma sonda radioactiva que consiste do iniciador de síntese de mutagénese marcado com ^{32}P, que inclui vectores recombinantes com o rearranjo da sequência mutada.

Após seleccionar um clone deste tipo, pode-se remover a região de selectina mutada e colocar num vector adequado para produção de selectina, geralmente um vector de expressão do tipo tipicamente utilizado para transformação de um hospedeiro eucariótico adequado. No contexto do presente invento, preferem-se células de ovário de hamster Chinês (CHO) ou células 293 (células de rim humano descritas por Graham *et al.* J. Gen. Virol., 36: 59 (1977)) para a preparação de produtores de selectina estáveis a longo prazo. No entanto, o invento não se limita à produção de CHO, pois é conhecido que vários outros tipos de células são adequadamente utilizados, particularmente quando se pretende apenas uma produção transiente da enzima, para fins de teste. Por exemplo, a seguir descreve-se um sistema transiente que utiliza células 293, que proporcionam um sistema conveniente para a produção de variantes de selectina, para fins analíticos.

Um outro método para produzir mutações na sequência de ADN que codifica para a selectina envolve a clivagem do ADN na posição adequada, por digestão com enzimas de restrição, recuperando o ADN clivado de forma adequada, sintetizando um oligonucleótido que codifica para o aminoácido desejado e regiões flanqueadoras, tais como poliligantes com extremidades rombas (ou em vez de utilizar poliligantes, digerir o oligonucleótido sintético com as enzimas de restrição também utilizadas para clivar o ADN que codifica para a selectina, criando deste modo, terminais coesivos) e ligando o ADN sintético ao remanescente do gene estrutural que codifica para a selectina.

Mutagénese por PCR

A mutagénese por PCR é também adequada para produzir variantes de aminoácidos de selectina do presente invento. Apesar de a discussão seguinte se referir ao ADN, deve

entender-se que a técnica também se aplica ao ARN. A técnica de PCR refere-se geralmente ao processo seguinte. Quando se utilizam pequenas quantidades de ADN modelo como material de partida numa PCR, podem-se utilizar iniciadores de síntese que diferem ligeiramente em sequência da região correspondente de um ADN modelo, para produzir quantidades relativamente grandes de um fragmento de ADN específico, que difere da sequência modelo apenas nas posições em que os iniciadores de síntese diferem do modelo. Para introdução de uma mutação num ADN plasmídeo, um dos iniciadores de síntese é concebido para se sobrepor à posição da mutação e para conter a mutação; a sequência do outro iniciador de síntese deverá ser idêntica a uma extensão da sequência da cadeia oposta do plasmídeo, mas esta sequência pode estar localizada noutro local, ao longo do ADN plasmídeo. É preferido, no entanto, que a sequência do segundo iniciador de síntese esteja localizada dentro de 200 nucleótidos da do primeiro, de modo a que no final, toda a região amplificada de ADN ligada pelos iniciadores de síntese possa ser facilmente sequenciada. A amplificação por PCR utilizando um par de iniciadores de síntese semelhante ao atrás descrito, resulta numa população de fragmentos de ADN que difere na posição da mutação especificada pelo iniciador de síntese e possivelmente noutras posições, uma vez que a cópia de um modelo está, de algum modo, sujeita a erro.

Se a razão entre material modelo e produto for extremamente baixa, a grande maioria dos fragmentos de ADN produto incorpora a(s) mutação(ões) adequadas. Este material produto é utilizado para substituir a região correspondente no plasmídeo que serviu como modelo para PCR, utilizando tecnologia de ADN convencional. As mutações em posições separadas podem ser introduzidas simultaneamente, quer utilizando um segundo iniciador de síntese mutante, quer realizando uma segunda PCR com diferentes iniciadores de síntese mutantes e ligando os dois fragmentos de PCR resultantes ao fragmento de vector, numa ligação de três (ou mais) parceiros.

Cultura de células hospedeiras e vectores

Embora se prefira em última análise a expressão em células de ovário de Hamster Chinês (CHO) e na linha celular de células de rim embriónico humano 293 [Urlaub e Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. Usa, 77, 4216 (1980); Graham *et al.* J. Gen. Virol. 36, 59 (1977)], para a produção de variantes de selectina, os vectores e métodos aqui descritos são adequados para utilização em células hospedeiras de uma grande variedade de organismos eucarióticos.

Em geral, obviamente, os procariotas são preferidos para a clonagem inicial de sequências de ADN e construção de vectores úteis para o invento. Por exemplo, a *E. coli*

K12 estirpe 294 (ATCC Nº 31,446) e a *E. coli* estirpe W3110 (ATCC Nº 27,325) são particularmente úteis. Outras estirpes microbianas adequadas incluem estirpes de *E. coli* como a *E. coli* B e *E. coli* X1776 (ATCC No 31,537). Estes exemplos são, obviamente, ilustrativos e não limitantes.

Os procariotas são também úteis para a expressão. As estirpes acima mencionadas, bem como bacilos tais como *Bacillus subtilis* e outras enterobactérias, como *e.g.*, *Salmonella typhimurium* ou *Serratia marcesans* e várias espécies de *Pseudomonas,* são exemplos de hospedeiros úteis para expressão.

Em geral, os vectores plasmídeos que contêm sequências de replicão e controlo derivadas a partir de espécies compatíveis com a célula hospedeira, são utilizados em conjunto com estes hospedeiros. O vector transporta normalmente um local de replicação, bem como sequências marcadoras capazes de proporcionar uma selecção fenotípica das células transformadas. Por exemplo, a *E. coli* é tipicamente transformada utilizando pBR22, um plasmídeo derivado de uma espécie de *E. coli* (veja-se, *e.g.*, Bolivar *et al* Gene 2: 95 (1977)). O pBR322 contém genes para resistência à ampicilina e tetraciclina, proporcionando assim um meio fácil para identificar as células transformadas. O plasmídeo pBR322, ou outro plasmídeo, ou fago microbiano deverão conter, ou ser modificado para conter, promotores que podem ser utilizados pelo organismo microbiano para expressão das suas próprias proteínas.

Os promotores mais vulgarmente utilizados na construção de ADN recombinante incluem os sistemas promotores de β-lactamase (penicilase) e lactose (Chang *et al.* Nature, 375: 615 (1978); Itakura *et al.*, Science 198: 1056 (1977); Goeddel *et al.* Nature, 281: 544 (1979)) e um sistema promotor de triptofano (trp) (Goeddel *et al.*, Nucl. Acids Res., 8: 4057 (1980); Ped. Publ. EPO Nº 36,776) e os sistemas de fosfatase alcalina. Apesar destes serem os mais vulgarmente utilizados, têm sido descobertos e utilizados outros promotores microbianos e estão publicados os pormenores relativos às suas sequências nucleotídicas, permitindo ao perito fazer a sua ligação de forma funcional, a vectores plasmídeo (veja-se, *e.g.*, Siebenlist *et al.*, Cell, 20: 269 (1980)).

Além dos procariotas, também se utilizam aqui de forma adequada micróbios eucarióticos, como as leveduras. A *Saccharomyces cerevisiae*, ou levedura de padeiro comum, é a mais usualmente utilizada de entre os microorganismos eucarióticos, embora estejam vulgarmente disponíveis várias outras estirpes. Por exemplo, para expressão em *Saccharomyces*, utiliza-se normalmente o plasmídeo YRp7 (Stinchcomb *et al.*, Nature, 282: 39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7: 141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene 10: 157 (1980)).

Este plasmídeo já contém o gene trp1, que proporciona um marcador seleccionável para uma estirpe mutante de levedura, que não tem a capacidade de crescer em triptofano, por exemplo, a ATCC Nº 44,076 ou PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)). A presença da lesão trp1 como uma característica do genoma da célula hospedeira de levedura, proporciona assim um ambiente eficaz para a detecção da transformação, através do crescimento na ausência de triptofano.

As sequências promotoras adequadas em vectores de levedura incluem os promotores para a 3-fosfoglicerato-quinase (Hitzeman *et al.* J. Biol. Chem, 255: 2073 (1980)), ou outras enzimas glicolíticas (Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland *et al.*, Biochemistry, 17: 4900 (1978)), tal como a enolase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, hexoquinase, piruvato-descarboxilase, fosfofrutoquinase, glucose-6-fosfato-isomerase, 3-fosfogliceratomutase, piruvato-quinase, triosefosfato-isomerase, fosfoglucose-isomerase e glucoquinase. Na construção de plasmídeos de expressão adequados, as sequências de terminação associadas com estes genes também estão ligadas ao vector de expressão 3' da sequência que se pretende expressar, de modo a proporcionar a poliadenilação do ARNm e a terminação. Outros promotores que têm a vantagem adicional de uma transcrição controlada por condições de crescimento são a região promotora para a álcool desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas degradativas associadas com o metabolismo do azoto e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase acima mencionada e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose. Qualquer vector plasmídeo que contenha sequências promotoras, de origem de replicação e de terminação compatíveis com leveduras, é adequado.

Além dos microorganismos, também se podem utilizar como hospedeiros cultura de células derivadas de organismos multicelulares. Em princípio, qualquer cultura de células deste tipo é utilizável, quer seja cultura de vertebrados, quer de invertebrados. No entanto, o interesse tem sido maior em células de vertebrados e a propagação de células de vertebrado em cultura (cultura de tecidos) tem-se tornado um procedimento de rotina em anos recentes [Tissue Culture, Academic Press, Kruse e Patterson, editores (1973)]. Exemplos destas linhas celulares hospedeiras úteis são as células VERO e HeLa, linhas celulares CHO e linhas celulares W138, BHK, COS-7 (ATCC CRL 1651), 293 e MDCK (ATCC CRL 34). Os vectores de expressão para estas células incluem vulgarmente (se necessário) uma origem de replicação, um promotor localizado na frente do gene a ser expresso, juntamente com quaisquer locais de ligação a ribossomas necessários, locais de ligação de ARN, locais de poliadenilação e sequências de terminação da transcrição.

Para utilização em células de mamífero, as funções de controlo nos vectores de expressão são muitas vezes proporcionadas pelo material viral. Por exemplo, os promotores vulgarmente utilizados são derivados de polioma, adenovírus2 e muito frequentemente de vírus de símio 40 (SV40). Os promotores iniciais e tardios do vírus SV40 são particularmente úteis pois ambos são obtidos facilmente a partir do vírus na forma de um fragmento que também contém a origem de replicação viral de SV40 (Fiers *et al.* Nature, 273: 113 (1978). Também se utilizam, adequadamente, fragmentos de SV40 menores ou maiores, desde que esteja incluída a sequência de aproximadamente 250 pb, que se estende desde o local de HindIII a té ao local de BgII, localizado na origem de replicação viral. Além disso, também é possível, e muitas vezes desejável, utilizar sequências promotoras ou controlo normalmente associadas com a sequência de genes desejada, desde que as sequências controlo sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras.

Uma origem de replicação é tipicamente proporcionada quer por construção do vector para incluir uma origem exógena, tal como se pode derivar a partir de SV40 ou outra fonte viral (*e.g.* Polioma, Adeno, VSV, BPV), ou pelo mecanismo de replicação cromossómico da célula hospedeira. Se o vector está integrado no cromossoma da célula hospedeira, o último é muitas vezes suficiente.

As culturas de células produzem quantidades satisfatórias de variantes de selectina humana; no entanto, os refinamentos, utilizando uma sequência codificante secundária, servem para aumentar ainda mais os níveis de produção. A sequência codificante secundária compreende di-hidrofolato-redutase (DHFR) que é afectada por um parâmetro controlado externamente, tal como o metotrexato (MTX), permitindo assim o controlo da expressão através do controlo da concentração de MTX.

Na selecção de uma célula hospedeira preferida para transfecção pelos vectores do invento, que compreendem sequências de ADN que codificam, tanto para a selectina variante, como para a proteína DHFR, é conveniente ter em conta o tipo de proteína DHFR utilizada. Quando se utiliza a proteína DHFR do tipo selvagem é preferido seleccionar uma célula hospedeira que seja deficiente em DHFR, permitindo assim a utilização da sequência codificante de DHFR como um marcador, para uma transfecção de sucesso em meio selectivo que não possui hipoxantina, glicina e timidina. Um exemplo de uma célula hospedeira adequada para este caso é a linha celular CHO, deficiente em actividade de DHFR, preparada e propagada, como descrito por Urlaub e Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980).

Por outro lado, quando se utiliza a proteína DHFR com baixa afinidade para MTX como sequência controlo, não é necessário utilizar células deficientes em DHFR. Uma vez que o DHFR mutante é resistente a MTX, podem-se utilizar meios contendo MTX como meio de selecção, desde que as próprias células hospedeiras sejam sensíveis ao MTX. As células hospedeiras eucarióticas que são capazes de absorver MTX parecem ser sensíveis ao MTX. Um exemplo de uma linha celular deste tipo é a linha CHO, CHO-K1 (ATCC Nº CCL 61).

Clonagem e metodologias de expressão típicas, disponíveis

Quando se utilizam células de mamífero como células hospedeiras, a transfecção é geralmente realizada pelo método de precipitação pelo fosfato de cálcio, tal como descrito por Graham e Van der Eb, Virology, 52: 546 (1978). No entanto, também se podem utilizar, adequadamente, outros métodos para introdução do ADN nas células, tais como injecção nuclear, electroporação, ou fusão de protoplastos.

Quando se utilizam leveduras como hospedeiro, a transfecção é geralmente realizada utilizando polietilenoglicol, como descrito em Hinnen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1929-1933 (1978).

Quando se utilizam células procarióticas ou células que contêm construções de parede celular substanciais, o método de transfecção preferido é o tratamento com cálcio utilizando cálcio, descrito por Cohen *et al.*, Proc. Natl. acad. Sci. (USA) 69: 2110 (1972), ou mais recentemente a electroporação.

A construção de vectores adequados que contêm as sequências codificantes e controlo desejáveis utilizam técnicas de ligação convencionais. Os plasmídeos ou fragmentos de ADN isolados são clivados, adaptados e religados na forma desejada, para formar os plasmídeos necessários.

A clivagem é realizada tratando com uma enzima (ou enzimas) de restrição num tampão adequado. Em geral, utilizam-se cerca de 1 μg de plasmídeo ou fragmentos de ADN com cerca de 1 unidade de enzima em cerca de 20 μl de tampões e as quantidades de substrato para enzimas de restrição particulares são especificadas pelo fabricante. Podem-se utilizar tempos de incubação de cerca de uma hora, a 37°C. Após a incubação, a proteína é removida por extracção com fenol e clorofórmio e o ácido nucleico é recuperado da fracção aquosa por precipitação com etanol.

Quando são necessárias extremidades rombas, a preparação pode ser tratada durante 15 minutos a 15°C com 10 unidades do fragmento Klenow da polimerase I de ADN (Klenow), extractada com fenol-clorofórmio e precipitada com etanol.

A separação por tamanhos destes fragmentos clivados é realizada utilizando um gel de poliacrilamida a 6 %, descrito por Goeddel *et al.*, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980).

Para a ligação, tratam-se quantidades aproximadamente equimolares dos componentes desejados, terminados com caudas adequadas, para proporcionar um emparelhamento correcto, com cerca de 10 unidades de ligase de ADN de T4 por 0,5 μg de ADN. (Quando se utilizam vectores clivados como componentes, pode ser útil prevenir a nova ligação do vector clivado por pré-tratamento com fosfatase alcalina bacteriana).

Tal como acima discutido, as variantes de selectina são preferencialmente produzidas por meio de uma mutação específica. As variantes úteis na prática do presente invento são formadas muito facilmente através da utilização de sequências de oligonucleótidos específicas, que codificam a sequência de ADN da mutação desejada, bem como um número suficiente de nucleótidos adjacentes, para proporcionar uma sequência de tamanho e complexidade de sequência suficientes para formar um duplex estável em ambos os lados da mutação a ser tratada.

Para análise para confirmar as sequências correctas nos plasmídeos construídos, utilizam-se tipicamente as misturas de ligação para transformar *E. coli* K12 (ATCC 31,446), ou outras estirpes de *E. coli* adequadas e os transformantes de sucesso são seleccionados por resistência a ampicilina ou tetraciclina, quando adequado. Os plasmídeos dos transformantes são preparados e analisados por mapeamento com enzimas de restrição e/ou sequenciação de ADN, pelo método de Messing *et al.*, Nucleic Acids Res., 9: 309 (1981), ou pelo método de Maxam *et al.*, Methods of Enzymology, 65: 499 (1980).

Após a introdução do ADN na célula hospedeira de mamífero e selecção num meio, de transformantes estáveis, a amplificação das sequências que codificam para a proteína DHFR é realizada fazendo crescer culturas de células hospedeiras na presença de concentrações de aproximadamente 20.000-500.000 nM de MTX, um inibidor competitivo da actividade de DHFR. A gama eficaz de concentração é altamente dependente, obviamente, da natureza do gene de proteína DHFR e das características do hospedeiro. Obviamente, os limites superior e inferior geralmente definidos não podem ser determinados. Também se podem utilizar concentrações adequadas de outros análogos de

ácido fólico ou outros compostos que inibem o DHFR. O próprio MTX é, no entanto, conveniente, disponível e eficaz.

Variantes de glicosilação

A glicosilação de polipéptidos é tipicamente ou ligada a N, ou ligada a O. O termo ligada a N refere-se à ligação da porção de hidrato de carbono à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências de tripéptidos, asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, em que X é qualquer aminoácido excepto prolina, são sequências de reconhecimento para ligação enzimática da porção de hidrato de carbono à cadeia lateral de asparagina. O termo glicosilação ligada a O refere-se à ligação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose a um hidroxiaminoácido, mais usualmente serina ou treonina, embora também possam estar envolvidas na glicosilação ligada a O, a 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina. Os locais de glicosilação ligada a O podem, por exemplo, ser modificados por adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina na sequência de aminoácidos do ligando. Para facilidade, as alterações são usualmente feitas ao nível do ADN, utilizando essencialmente as técnicas discutidas acima no que se refere às variantes de sequências de aminoácidos.

Também se pode utilizar o acoplamento químico ou enzimático de glicósidos às variantes de selectina do presente invento, para modificar ou aumentar o número ou perfil de substituintes de hidratos de carbono. Estes procedimentos são vantajosos, na medida em que não necessitam da produção do polipéptido capaz de realizar a glicosilação ligada a O (ou ligada a N). Dependendo do modo de acoplamento utilizado, o(s) açúcar(s) pode(m) ser ligado(s) a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo livres, (c) grupos hidroxilo livres, como os da cisteína, (d) grupos sulfidrilo livres, como os da serina, treonina ou hidroxiprolina, (e) resíduos aromáticos como os de fenilalanina, tirosina ou triptofano ou (f) o grupo amida de glutamina. Estes métodos estão descritos na WO 87/05330 (publicada em 11 de Setembro de 1987) e em Aplin e Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 255-306 (1981).

As porções de hidrato de carbono presentes numa variante de selectina podem também ser removidas química ou enzimaticamente. A desglicosilação química requer exposição a ácido trifluorometanosulfónico ou um composto equivalente. Este tratamento resulta na clivagem da maioria dos açúcares, excepto o açúcar ligante, deixando ao mesmo tempo o polipéptido intacto. A desglicosilação química é descrita por Hakimuddin *et al.*, Arch. Biochem. Biophys, 259, 52 (1987) e por Edge *et al.* Anal Biochem., 118, 131 (1981). As porções de hidrato de carbono podem ser removidas por uma variedade de endo e

exoglicosidades, como descrito por Thotakura *et al.* Methods Enzymol. 138: 350 (1987). A glicosilação é eliminada por tunicamicina, como descrito por Duskin *et al.*, J. Biol. Chem., 257, 3105 (1582). A tunicamicina bloqueia a formação de ligações proteína-N-glicosidase.

As variantes de glicosilação das variantes aqui descritas também podem ser produzidas seleccionando células hospedeiras adequadas. A levedura por exemplo, introduz uma glicosilação que difere significativamente da de sistemas mamíferos. De modo semelhante, as células de mamífero provenientes de espécies (*e.g.* hamster, murídeo, insecto, porcino, bovino ou ovino) ou tecidos (*e.g.* de pulmão, de fígado, linfóide, mesenquimal ou epidermal) diferentes dos da fonte da variante de selectina, são pesquisados de forma rotineira quanto à capacidade de introduzir uma glicosilação variante.

Modificações covalentes

As modificações covalentes de uma molécula variante de selectina estão incluídas no âmbito do presente invento. Estas modificações são tradicionalmente introduzidas reagindo resíduos de aminoácidos alvo da selectina variante, com um agente derivatizante orgânico, que é capaz de reagir com cadeias laterais seleccionadas ou resíduos terminais, ou por mecanismos de junção de modificações pós-traducionais que funcionam em células hospedeiras recombinantes, seleccionadas. Os derivados covalentes resultantes são úteis em programas direccionados para a identificação de resíduos importantes para actividade biológica, para imunoensaios dos ligandos de selectina, ou para a preparação de anticorpos ligando anti-selectina para purificação por imunoafinidade da glicoproteína recombinante. Por exemplo, a inactivação completa da actividade biológica da proteína, após reacção com ninidrina sugere que pelo menos um resíduo de arginilo ou lisilo é crítico para a sua actividade, e em seguida os resíduos individuais que foram modificados nas condições seleccionadas são identificados por isolamento de um fragmento de péptido que contém o resíduo de aminoácido modificado. Estas modificações estão no âmbito da arte e são realizadas sem experimentação indevida.

A derivação com agentes bifuncionais é útil para preparar agregados intramoleculares das variantes de selectina, bem como para o entrecruzamento das variantes de selectina numa matriz suporte ou superfície insolúvel em água, para utilização em testes, ou purificação por afinidade. Além disso, um estudo do intercruzamento inter-cadeia poderá fornecer uma informação directa sobre a estrutura conformacional. Os agentes de entrecruzamento vulgarmente utilizados incluem ésteres de 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, gluteraldeído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, imidoésteres homobifuncionais e maleimidas bifuncionais. Os agentes de derivatização, como o metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato

originam intermediários foto-activáveis, que são capazes de formar entrecruzamentos na presença de luz. Alternativamente, as matrizes insolúveis em água reactivas, como os hidratos de carbono activados com brometo de cianogénio e os sistemas de substratos reactivos descritos nas patentes U.S. N°s 3,959,642; 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; 4,055,635 e 4,330,440 são utilizados para imobilização de proteínas e entrecruzamento.

Algumas modificações pós-traducionais são o resultado da acção de células hospedeiras recombinantes no polipéptido expresso. Os resíduos de glutaminilo e asparaginilo são muitas vezes desamidados pós-traducionalmente, nos resíduos de glutamilo e aspartilo correspondentes. Alternativamente, estes resíduos são desamidados sob condições ácidas suaves. Qualquer das formas destes resíduos está no âmbito do presente invento.

Outras modificações pós-traducionais incluem a hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxilo de resíduos de serilo ou tirosilo, metilação de grupos α-amino de cadeias laterais de lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco pp. 79-86 (1983)].

Outros derivados compreendem as novas variantes de selectina do invento ligadas de forma covalente a um polímero não proteico. O polímero não proteico é vulgarmente um polímero sintético hidrófilo, *i.e.* um polímero que não se encontra de outro modo na natureza. No entanto, os polímeros que existem na natureza e são produzidos por métodos recombinantes ou *in vitro* são úteis, tal como o são os polímeros isolados da natureza. Os polímeros de polivinilo hidrófilos estão no âmbito do presente invento, *e.g.* polivinilálcool e polivinilpirrolidona. Os ésteres de polivinilalquileno são particularmente úteis, tais como o polietilenoglicol, polipropilenoglicol.

As variantes de selectina podem ser ligadas a vários polímeros não proteináceos, como o polietilenoglicol, polipropilenoglicol ou polioxialquilenos, do modo descrito nas Patentes U.S. N°s 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 ou 4,179,337.

As variantes de selectina podem ser englobadas em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, em sistemas de fornecimento de medicamentos coloidais (*e.g.* lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas), ou em macroemulsões. Estas técnicas são descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edição, Osol, A. Ed. (1980).

Construção de quimeras de imunoglobulina variantes de selectina

Pode-se ligar uma sequência variante de selectina a uma sequência de domínio constante de imunoglobulina como anteriormente descrito. As moléculas resultantes são vulgarmente referidas como quimeras de selectina imunoglobulina. Estas quimeras podem ser construídas essencialmente como descrito em WO 91/08298 (publicado em 13 de Junho de 1991).

Vulgarmente, a variante de selectina é fundida pelo terminal C ao terminal N da região constante de uma imunoglobulina, em vez da(s) região(ões) variável(eis), no entanto as fusões N-terminais das variantes de selectina também são desejáveis. As regiões transmembranares das variantes de selectina são preferencialmente inactivadas, ou eliminadas antes da fusão.

Tipicamente, estas fusões retêm pelo menos as juntas CH2 e CH3 funcionalmente activas da região constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina. As fusões também são realizadas no terminal C da porção Pc de um domínio constante, ou imediatamente N-terminal em relação ao CH1 da cadeia pesada ou da região correspondente da cadeia leve. Isto é normalmente conseguido construindo a sequência de ADN adequada e fazendo a sua expressão numa cultura de células recombinante. Alternativamente, no entanto, as quimeras de variante selectina de imunoglobulina do presente invento podem ser sintetizadas de acordo com métodos conhecidos.

O local exacto em que a fusão é realizada não é crítico; são bem conhecidos locais particulares e estes podem ser seleccionados de modo a optimizar a actividade biológica, secreção ou características de ligação da variante de selectina.

Nalgumas formas de concretização, as imunoglobulinas híbridas estão organizadas como monómeros, ou hetero ou homo-multímeros e em particular como dímeros ou tetrameros, essencialmente como ilustrado na WO 91/0829B, supra.

Numa forma de concretização preferida, o terminal-C de uma sequência que contém o(s) local(ais) de ligação para um ligando de selectina, é fundido ao terminal-N da porção de terminal-C de um anticorpo (em particular o domínio Fc), contendo as funções efectoras de uma imunoglobulina, *e.g.* imunoglobulina G_1. É possível fundir toda a região constante da cadeia pesada com a sequência que contém o(s) local(ais) de ligação ao ligando. No entanto, mais preferencialmente, utiliza-se nesta fusão uma sequência que começa na região da junta, imediatamente a montante do local de clivagem da papaína (que define quimicamente o Fc

da IgG; resíduo 216, tomando o primeiro resíduo da região constante da cadeia pesada como 114 [Kobel *et al.*, supra], ou locais análogos de outras imunoglobulinas). Numa forma de concretização particularmente preferida, a sequência de aminoácidos que contém o local(ais) de ligação ao ligando (de preferência retendo os domínios tipo egf e de ligação ao complemento) é fundida com a região de junta e C_H^2 e C_H^3, ou domínios C_H^1, junta e C_H2 e C_H3 de uma cadeia pesada de IgG_1, IgG_2 ou IgG_3.

O local exacto em que a fusão é realizada não é crítico, e o local óptimo pode ser determinado por experimentação de rotina.

III. *Variantes de selectina preferidas*

Normalmente, as variantes de selectina do presente invento terão um domínio de lectina, cuja sequência de aminoácidos é substancialmente homóloga (normalmente mais que 80% com base na identidade completa dos aminoácidos, ignorando inserções ou eliminações) à de uma molécula de selectina nativa, mas contém uma ou mais substituições, eliminações ou inserções de resíduos de aminoácidos num ou mais locais específicos deste domínio. As moléculas de selectina variante do presente invento podem exibir uma afinidade alterada (de preferência melhorada) para ligação a um ligando de selectina nativa correspondente, como resultado da(s) alteração(ões) nos seus domínios de lectina. As variantes de sequência de aminoácidos do presente invento inovadoras, são uma ou uma combinação de variantes de substituição, inserção ou eliminação em determinados locais que foram identificados pelos requerentes como importantes, ou com influência na modulação das propriedades de ligação das selectinas aos ligandos.

Os resíduos de aminoácidos identificados como estando primeiramente envolvidos no reconhecimento de ligandos de hidratos de carbono de selectinas são um retalho relativamente pequeno na superfície do domínio de lectina da selectina, próximo da folha beta anti-paralela formada pelos terminais N e C ligados por dissulfureto e a dobra ligada por dissulfureto adjacente, formada pelas duas cisteínas internas. Com base em evidências experimentais descritas nos Exemplos, pensa-se em especial que os resíduos de aminoácidos carregados positivamente nesta região são críticos para o reconhecimento de hidratos de carbono. Deste modo, é esperado que as alterações nesta região e em especial em aminoácidos carregados positivamente, tenham uma maior influência nas propriedades de ligação ao ligando da molécula de selectina.

Em geral, as alterações substanciais nas propriedades de ligação ao ligando da molécula de selectina podem ser obtidas por substituição de aminoácidos na região acima

identificada, que tem cadeias laterais significativamente diferentes das do resíduo nativo nesse local. É esperado que essas substituições afectem (a) a estrutura do esqueleto de polipéptido na área de substituição, por exemplo como uma folha ou conformação helicoidal, (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no local alvo, ou (c) o volume da cadeia lateral. As substituições que se espera causem as maiores alterações nas propriedades químicas e/ou físicas da molécula de selectina são aquelas em que (a) um resíduo básico (carregado positivamente) é substituído por um resíduo alifático ou aromático, (b) um resíduo ácido é substituído por um resíduo alifático ou aromático, (c) um resíduo hidrófilo é substituído por um resíduo aromático ou alifático, (d) um resíduo aromático é substituído por um resíduo ácido ou básico, (e) um resíduo alifático é substituído por um resíduo ácido ou básico ou (f) um resíduo não polar é substituído por um resíduo ácido ou básico.

Em particular, os três resíduos de aminoácidos carregados positivamente que se verificou serem críticos para o reconhecimento de sLex pela E-selectina, arginina (R) no resíduo número 97, lisina (K) no resíduo número 111 e lisina (K) no resíduo número 113, estão localizados muito próximo uns dos outros no modelo de E-selectina apresentado na Figura 7. A lisina nas posições de aminoácidos 111 e 113 é conservada em todas as três selectinas de várias espécies diferentes. Assim, pensa-se que a presença de um resíduo carregado positivamente, *e.g.* lisina, nesta posição, é essencial para ligação de ligandos. A substituição deste resíduo de aminoácido por um aminoácido não carregado (alanina) aboliu completamente o reconhecimento de sLex. A substituição de arginina na posição 97 do domínio de lectina da selectina é conservada apenas na 5- e L-selectina, enquanto que a P-selectina tem serina (um aminoácido não carregado hidrófilo) neste local. Na E-selectina, a substituição da alalina por este resíduo aboliu a ligação de sLex e, assim, este resíduo também é crítico para o reconhecimento de hidratos de carbono.

Uma verificação completamente inesperada foi o aumento na afinidade de ligação ao ligando, observada em resultado da substituição de alanina por ácido glutâmico (um resíduo carregado), na posição 8 da sequência de aminoácidos da E-selectina. A L- e P-selectina contêm uma carga positiva (K) neste local, tendo-se verificado que a sua mutação para alanina, na L-selectina, melhora significativamente o reconhecimento de sLex (Exemplo 2).

Assim, podem-se esperar alterações substanciais nas propriedades de ligação de ligandos de uma molécula de selectina a partir das alterações no retalho acima identificado do domínio de lectina da selectina e, em particular, da substituição de resíduos de aminoácidos carregados por resíduos não carregados, nas posições acima descritas. Além da carga, o volume do aminoácido é um factor importante.

Na Tabela 1 a seguir são indicados exemplos de moléculas de selectina variante, construídas como variantes de substituição de selectinas, de locais únicos.

Tabela 1

Local de modulação	Subst. preferido	Subst. alternativo
E8 (K8*)	A	V, S, T
R97**	K, H	S, T, N, Q, E, D
K111	R, H	S, T, N, G, E, D
K113	R, H	S, T, N, G, E, D

* para L- e P-selectina

** para E- e L-selectina

Além das moléculas de selectina variantes de substituição num único local, apresentadas na Tabela 1, as moléculas variantes, de substituição em múltiplos locais preferidas incluem qualquer dos aminoácidos anteriores substituídos na posição 8 do domínio de lectina da selectina, combinados com uma ou mais das alterações anteriores nas posições 97, 111 e 113.

São possíveis substituições semelhantes nas regiões de aminoácidos 7-9, 43-48, 82-86 e 90-109 e especificamente nas posições 7, 8, 9, 47, 48, 82, 84, 86, 94, 96, 98 e 100, isoladas ou em combinação.

As variantes retêm preferencialmente os domínios do tipo egf e os domínios de ligação ao complemento das selectinas nativas, mas podem compreender alterações adicionais (e.g. substituições de aminoácidos conservativas) noutras partes da molécula, sem afectar de forma significativa as propriedades de ligação ao ligando das variantes resultantes. Também são possíveis outras alterações em regiões do domínio de lectina identificadas como não estando envolvidas na ligação do ligando.

A informação aqui descrita acerca dos locais de ligação ao ligando das selectinas pode ser ainda refinada por outros estudos de mutagénese, como por exemplo por exploração homóloga ou por mutagénese de exploração de alanina de alta resolução [Cunningham, B.C. *et al.*, Science 243: 1330-1336 (1989); Cunningham, B.C. e Wells, J.A. Science 244: 1081-1085 (1989); para revisão veja-se Wells, J.A. Methods Enzymol., 202: 390-411 (1991)) e por fim, determinando as estruturas de cristal das selectinas nativas.

IV. *Composições terapêuticas*

As variantes de selectina com uma afinidade de ligação ao ligando melhorada podem ser utilizadas para bloquear a ligação de um receptor de selectina correspondente ao seu ligando nativo. Por exemplo, uma variante de L-selectina com propriedades de ligação ao ligando melhoradas bloqueia eficazmente a ligação de um receptor de L-selectina num leucócito circulante ao seu ligando nativo numa célula endotelial. Esta propriedade é útil para tratar um sintoma ou condição associado com a ligação excessiva de leucócitos circulantes a células endoteliais, tais como inflamação associada com artrite reumatóide, psoríase, esclerose múltipla, etc.

As variantes de selectina do presente invento podem ser formuladas de acordo com métodos conhecidos para preparar composições farmacêuticas úteis, em que o ligando é combinado em mistura com um transportador farmaceuticamente aceitável. Os transportadores adequados e as suas formulações estão descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., 1980, Mack Publishing Co., editado por Oslo *et al.*. Estas composições irão conter tipicamente uma quantidade eficaz de variante de selectina, por exemplo, da ordem de cerca de 0,5 a cerca de 10 mg/ml, juntamente com uma quantidade eficaz de transportador, para preparar composições farmaceuticamente aceitáveis adequadas para a administração eficaz ao paciente. As variantes poderão ser administradas parentericamente, ou por outros métodos que asseguram o seu fornecimento à corrente sanguínea de uma forma eficaz.

As composições particularmente bem estudadas para administração clínica de variantes de selectina, utilizadas na prática do presente invento incluem soluções aquosas estéreis ou pós hidratáveis estéreis, como proteínas liofilizadas.

Tipicamente, também se utiliza uma quantidade farmaceuticamente aceitável de sal na formulação, para tornar a formulação isotónica.

As dosagens e concentrações de medicamento desejadas do presente invento poderão variar dependendo da utilização particular em vista.

Nos exemplos seguintes, não limitantes, são ilustrados outros pormenores do invento.

V. *Exemplos*

EXEMPLO 1

A. *Procedimentos experimentais*

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais anti-e-selectina

Produziram-se anticorpos monoclonais tanto de E-selectina humana, como de coelho, por imunização de ratinhos com células COS que expressam E-selectina de forma transiente. As células COS (5 x 10^7/0,8 ml em solução salina tamponada com fosfato (DPBS) foram transfectadas por electroporação (350 V, 250 μF, Eio-Rad Gene Pulser) com 20 μg de ADNc de E-selectina humana ou de coelho, incubadas em gelo durante 10 min, resuspensas em meio de Eagle modificado da Dulbecco (DMEM)/10% soro fetal de bovino (FBS) e plaqueadas a 10^7 células/frasco de cultura de tecidos de 225 cm^2. As células transfectadas foram recolhidas de forma não enzimática às 48-72 h, lavadas duas vezes e resuspensas em DPBS. Os ratinhos foram rotineiramente imunizados i.p. com 1 x 10^7 células e foi-lhes dado reforço a cada 2-3 semanas. Produziram-se hibridomas por fusão de esplenócitos de ratinho imunizado com células SP2/0, utilizando técnicas convencionais [Galfre *et al.* Nature 266, 550-552 (1977)]. Os sobrenadantes dos hibridomas foram pesquisados por meio de um imunoensaio de ligação diferencial ligado a enzimas (ELISA), a placas de microtítulo Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA.), revestidas com extractos de detergente de membranas de células COS transfectadas com E-selectina e controlo/não transfectadas. As fracções brutas de membranas foram extractadas em 2% de Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5 (2,5 x 10^8 equivalentes celulares/ml). Os extractos foram diluídos em 50 nM de Na_2CO_3 pH 9,6 e revestidos directamente em placas de teste. Também se pesquisaram anticorpos anti-humanos por testes ELISA para ligação selectiva a células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), tratadas durante 4 h com rhIL-1a (550 pg/ml) e rhTNF (400 U/ml), comparado com HUVECs não tratados. A especificidade destes mAb's foi confirmada com HUVECs tratadas com citóquinas e células COS transfectadas de forma transiente, por análise de manchas imuno, imunoprecipitação e imunofluorescência indirecta (Wolitzky *et al.*, em preparação).

Produziram-se os Mab 7H5 (IgG3), 8E4 (IgG2A), 3B7 (IgG1), 1D6 (IgG1), 4D9 (IgG3), 1E5 (IgG1), 9A1 (IgG1), 7E10 (IgG1) e 1B3(IgM) contra a E-selectina humana, enquanto que os Mab's 14G2 (IgG1), 11G5 (IgM) e 9H9 (IgM) foram produzidos contra a E-selectina de coelho. Produziram-se ascites por técnicas convencionais [Hoogenraad e Wraight, Methods Enzymol. 121, 375-381 (1986)] e os anticorpos foram purificados pelo

método de precipitação do ácido caprílico, como descrito [Reik *et al.*, J. Immunol. Methods 100, 123 (1987)]. Os Mabs BBA1 e BBA2 foram adquiridos em British Biotechnology (Oxford, England), enquanto que o Mab ENA-1 foi adquirido em San Bio (Uden, Holanda).

Testes de adesão

Trataram-se culturas confluentes de HUVECs plaqueadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços revestidas com gelatina (Costar Corp. Cambridge, MA) durante 4 h com rhIL-1a (550 pg/ml) e rhTNF (400 U/ml). Os poços foram lavados três vezes com DPBS e incubados durante 1 h a 37°C em DPBS contendo 1% de BSA e 10 μg/ml de Mab determinado. As células HL60 foram lavadas duas vezes e resuspensas em meio RPMI 1640 (GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y.) a 5 x 10^6 células/ml e marcadas durante 30 min a 37°C com 40 μg/ml de 6-carboxifluoresceína (6-CFDA). Adicionaram-se células carregadas com 6-CFDA (100.000/poço) e incubou-se durante 20 min a 25°C. Encheram-se os poços com RPMI e selaram-se as placas, inverteram-se e giraram-se durante 6 min a 500 x g. Removeram-se as células não aderentes por aspiração e leram-se as placas num leitor de placas fluorescente CytoFluor 2300 (Millipore Corp., Bedford, MA).

Plaquearam-se células COS a 5 x 10^5 células/poço de 35 mm de diâmetro, 18 h antes da transfecção. Lavaram-se as células com DPBS e adicionaram-se 2 μg de ADN a 1 ml de DMEM contendo 10% de Nutridoma (Boehringer-Mannheim, Indianapolis), 50 μM de cloroquina e 500 ng/ml de DEAE dextrano. Após incubação durante 2,5 h a 37°C, aspiraram-se os poços e incubaram-se as células em meio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) contendo 10% de FBS e 10% de DMSO, durante 2,5 min. Os poços foram aspirados e cresceram-se as células em IMDM contendo 10% de FBS a 37°C, durante 48-72 h. Para testes de adesão, adicionaram-se 5 x 10^6 células HL60 carregadas com 6-CFDA a cada poço de 35 mm de diâmetro e incubou-se durante 30 min, a 25°C. Os poços foram lavados 3 vezes com RPMI e determinou-se a fluorescência associada com células aderentes, num leitor de placas CytoFluor 2300.

Imunofluorescência indirecta

Fixaram-se células COS transfectadas de forma transiente em DPBS contendo 1% (p/v) de formaldeído, durante 15 min a 25°C. Após duas lavagens com DPBS, as células foram bloqueadas com DPBS contendo 10% de soro de cavalo (DPBS/10%HS) durante 30 minutos à temperatura ambiente. As células foram incubadas durante 30 min com 5 μg/ml de mAb's 387, 8E4, 7H5 ou 14G2 em DPBS/10%HS, e em seguida lavou-se três vezes com DPBS. Após uma incubação de 30 min com IgG de cabra anti-ratinho, conjugada com

rodamina, as células foram lavadas com DPBS e a fluorescência foi observada num microscópio Zeiss Axioskop.

Construções de E-selectina quimérica humano-coelho

A expressão de formas truncadas de E-selectina humana e de coelho na superfície de células COS foi conseguida por fusão de sequências de selectina com os 37 aminoácidos do terminal carboxi de CD16, que contém a sequência sinal para a ancoragem na superfície celular, através de uma ligação glicosil-fosfatidilinositol (GPI) [Scallon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 5079-5083 (1989)]. Todos os fragmentos de E-selectina foram produzidos por reacção em cadeia com polimerase (PCR) e clonados no vector plasmídeo pBC12BI [Cullen, B.R. Methods in enzymology (eds. Berger, S.L. e A.R. Kimmel) 152, 684-704 (1987)] que foi modificado de modo a conter as sequências de CD16. Os genes recombinantes foram expressos utilizando o codão de iniciação Met do gene de pró-insulina de rato em pBC12BI e o produto de tradução principal contém cinco aminoácidos derivados a partir da sequência sinal da insulina. a construção de lectina humana-egf continha os aminoácidos -15 a +157 [Bevilacqua *et al.* Science 243, 1160-1165 (1989)], a lectina de coelho-egf continha os resíduos -17 a +156 [Larigan *et al.*, J. of DNA and Cell Biology 11, 149-162 (1992)], enquanto que o HuRa-1 continha os aminoácidos -15 a +9 da E-selectina humana, contíguos aos resíduos 10 a 156 da E-selectina de coelho. As sequências de CD16 necessárias para a ancoragem de GPI à superfície celular foram fundidas aos terminais carboxi de cada construção.

Construção e expressão de mutantes de quimeras E-selectina-IgG

A produção e caracterização da quimera E-selectina-IgG foi anteriormente descrita (Foxall *et al.*, 1992, supra). Introduziram-se mutações no domínio de lectina desta quimera, pelo método de Kunkel [Kunkel *et al.*, Methods in Enzymol, 154, 367-382 (1987)] utilizando o kit de mutagénese in vitro Muta-Gene Phagemid (BioRad), de acordo com as instruções do fabricante. Os mutantes correctos foram conformados por sequenciação de ADN e as quimeras mutantes foram expressas de forma transiente e secretadas por transfecção de células 293 [Watson *et al.*, Nature 349, 164-167 (1991)]. A concentração de cada quimera nos sobrenadantes resultantes foi então quantificada por ELISA, utilizando um mAb de ratinho específico de IgG1-Fc anti-humano, como anteriormente descrito [Watson *et al.*, J. Cell Biol. 110, 221-2229 (1990)]. Os locais de mutações pontuais são definidos utilizando a nomenclatura de Cunningham e Wells (1989); resíduo do tipo selvagem – resíduo de posição mutante.

Sequências de oligonucleótidos utilizadas para a mutagénese:

NOME	SEQUÊNCIA (5' → 3')	Nº ID. SEQ.
E-selectina-E8A	5'-ATA AGT CAT AGC GGC CGT GSA GGT GTT -3'	1
E-selectina-M10A	5'-CTC ATT ATA AGT GGC AGC TTC CGT GGA-3'	2
E-selectina-Y12A	5'-ACT GGC CTC ATT GGC AGT CAT AGC TTC-3'	3
E-selectina-E14A	5'-ATA AGC ACT GGC TGC ATT ATA AGT CAT-3'	4
E-selectina-K32A	5'-CTC AAT CTC TTC TGC GTT TTG AAT TGC-3'	5
E-selectina-S43A	5'-ACT TGG TGA ATA GGC CAA TAT GSA GTT'3'	6
E-selectina-Y44A	5'-ATA ACT TGG TGA AGC GCT CAA TAT GGA-3'	7
E-selectina-S45A	5'-GTA ATA ACT TGG TGC ATA GCT CAA TAT-3'	8
E-selectina-P46A	5'-CCA GTA ATA ACT TGC TGA ATA GCT CAA-3'	9
E-selectina-S47A	5'-AAT CCA GTA ATA AGC TGG TGA ATA GCT-3'	10
E-selectina-Y48A	5'-TCC AAT CCA GTA AGC ACT TGG TGA ATA-3'	11
E-selectina-Y49A	5'-GAT TCC AAT CCA GGC ATA ACT TGG TGA-3'	12
E-selectina-K67A	5'-TTC TTC TGT CAG AGG CGC CTG GGT TCC TAC CCA-3'	13
E-selectina-K74A	5'-GGG TTC ACC TGG CGC CCA GTT CGC GGC TTC TTC TGT-3'	14
E-selectina-R84A,K86A	5'-CAC GCA GTC CTC ATC TGC TTG CGC ATT GTT GGG TTC ACC-3'	15
E-selectina-E92A	5'-CTT GAT GTA GAT GGC CAC GCA GTC CTC-3'	16
E-selectina-I93A	5'-TCT CTT GAT GTA GGC CTC CAC GCA GTC-3'	17
E-selectina-Y94A	5'-TTC TCT CTT GAT GGC GAT CTC ACA GCA-3'	18
E-selectina-I95A	5'-TTT TTC TCT CTT GGC GTA GAT CTC CAC-3'	19
E-selectina-K96A	5'-ATC TTT TTC TCT CGC GAT GTA GAT CTC-3'	20
E-selectina-R97A	5'-CAC ATC TTT TTC AGC CTT GAT GTA GAT-3'	21
E-selectina-E98A	5'-GCC CAC ATC TTT GGC TCT CTT GAT GTA-3'	22
E-selectina-K99A	5'-CAT GCC CAC ATC GGC TTC TCT CTT GAT-3'	23
E-selectina-D100A	5'-CCA CAT GCC CAC GGC TTT TTC TCT CTT-3'	24
E-selectina-V101A	5'-ATT CCA CAT GCC AGC ATC TTT TTC TCT-3'	25
E-selectina-M103A	5'-CTC ATC ATT CCA TGC GCC CAC ATC TTT-3'	26
E-selectina-E107A	5'-CTT GCT GCA CCT CGC ATC ATT CCA CAT-3'	27
E-selectina-K111A	5'-GGC AAG CTT CTT GGC GCT GCA CCT CTC-3'	28
E-selectina-K113A	5'-GCA TAG GGC AAG AGC CTT CTT GCT GCA-3'	29
E-selectina-S2T, N4H, T5Y	5'-AGC TTC CGT GSA GTA GTG GTA AGT CCA GGC TCC ACT-3'	30
E-selectina-T7A,A9N	5'-ATT ATA AGT CAT ATT TTC CGC GGA GGT GTT GTA-3'	31
E-selectina-M10Y, T11S, Y12W	5'-ACT GGC CTC ATT CCA ACT GTA AGC TTC CGT GGA-3'	32
E-selectina-E98P, V101T	5'-ATT CCA CAT GCC CGT ATC TTT TGG TCT CTT GAT GTA-3'	33
L-selectina-K8A	5'-CCA GTT CAT GGG GGC TTC AGA ATA ATG-3'	34
P-selectina-K8A	5'-CCA TGA GTA TGC AGC TGT GCT GTA ATG-3'	35

Ligação a anticorpo monoclonal de mutantes de K-selectina-IgG

A reactividade das quimeras mutantes de E-selectina-IgG com os vários anticorpos foi determinada utilizando um formato ELISA anteriormente descrito [Watson *et al.*, 1990, supra), em que se revestiram placas de microtítulo com Mab purificados e em seguida se bloqueou com BSA, e incubou-se sobrenadante de células 293, contendo concentrações iguais de quimeras tipo selvagem ou mutantes nos poços, seguido de lavagem e detecção das quimeras capturadas com anticorpo Fc policlonal de cabra anti-humano, conjugado com HRP.

Ligação a sialilo Lewis X de mutantes de E-selectina-IgG

Os testes para a ligação de quimeras de E-selectina-IgG a glicolípidos sLex imobilizados foram realizados essencialmente como descrito (Foxall *et al.*, 1992, supra). Em resumo, os glicolípidos SLex foram secos em poços de microtítulo, lavados com água destilada e em seguida bloqueados com BSA. Diluiu-se IgG Fc de cabra anti-humano F(ab'), biotinilado, e fosfatase alcalina-estreptavidina (Caltag, São Francisco do sul, CA) cada um, diluído a 1:1000 em sobrenadantes de células 293 contendo concentrações iguais de quimeras tipo selvagem ou mutantes e deixou-se formar um complexo antes da adição aos poços. Estes sobrenadantes foram então incubados nas superfícies revestidas com glicolípido sLex, seguido de lavagem, adição de substrato (p-nitrofenilfosfato) e medição de D.O. a 405 nm.

Produção de um modelo do domínio de lectina da E-selectina

O modelo de E-selectina foi produzido com base na estrutura de cristal da proteína de ligação à manose (MBP) de rato [Weis *et al.*, 1991, supra). A sequência da E-selectina foi alinhada com a da L-selectina de ratinho (LHR) [Lasky *et al.*, Cell 56, 1045-1055 (1989)] e MBP utilizando o alinhamento das duas últimas proteínas fornecidas [Weis *et al.*, 1991, supra). Mapearam-se onze inserções e duas eliminações na E-selectina em relação à MBP, em quatro dobras de superfície na estrutura de MBP. A MBP (molécula 1) foi transformada em E-selectina em três passos. Primeiro, todos os resíduos, excepto os que envolvem inserções/eliminações, foram alterados para a sequência de E-selectina, utilizando o programa INSIGHT-II (Biosym Technologies, San Diego). Quando possível, as conformações das cadeias laterais da E-selectina foram mantidas semelhantes às da MBP, ou, caso contrário, baseavam-se em bibliotecas de rotâmeros [Ponder e Richards, J. Mol. Biol, 193, 775-791 (1987)] considerações de empacotamento e ligações de hidrogénio. Em segundo lugar, as estruturas de dobra possíveis para as inserções/eliminações de E-selectina

foram apuradas a partir de uma pesquisa das estruturas de cristal no banco de dados de proteínas [Berstein *et al.*, J. Mol. Biol., 112, 535-542 (1977)) utilizando o programa INSIGHT-II. Em terceiro lugar, cada uma das trinta moléculas de água presentes na estrutura de cristal da MBP foi avaliada independentemente da sua retenção no modelo de E-selectina. Apenas foram incluídas sete águas no modelo de E-selectina, quatro das quais correspondem às moléculas de água da MBP, 23, 24, 25 e 30.

O modelo de E-selectina foi submetido a 6000 ciclos de minimização de energia, utilizando o programa DISCOVER (Biosym Technologies, San Diego). Utilizou-se o campo de forças de AMBER all-atom [Weiner *et al.* J. Am. Chem Soc., 106, 765-784 (1984), Weiner *et al.* J. Comp. Chem. 7, 230-252 (1986)] para todos os cálculos, utilizando uma exclusão de 14Å para as interacções não ligadas e um dieléctrico linear (e = 4,0*r). Adicionaram-se átomos de hidrogénio à estrutura, utilizando o INSIGHT-II, e as posições dos hidrogénios nas cadeias laterais de Ser, Thr e Tyr e nas moléculas de água foram verificadas visualmente quanto a um alinhamento adequado em ligações de hidrogénio, caso existentes. A minimização de energia foi realizada em seis fases de 1000 ciclos cada. Na fase 1, utilizou-se uma minimização de degraus descendentes, com os átomos de Ca dos resíduos S2-V27, Q30-S40, Y49-R54, W60-V61, N75-N82, E88-I93 e W103-T119 restringidos às suas posições iniciais, utilizando uma força constante de 100 kcal/Å. Também se invocaram 105 restrições de ligações de hidrogénio (50 kcal/ml), envolvendo inicialmente ligações de hidrogénio entre os resíduos nas cadeias-b e hélices-a. Isto permitiu que as estruturas de dobra e as cadeias laterais se movessem, preservando ao mesmo tempo a integridade da estrutura secundária presente no modelo de E-selectina. Nas fases 2 e 3, a constante de força de travão de Ca foi reduzida para 50 e 10 kcal/Å, respectivamente e utilizou-se uma minimização dos gradientes conjugados. Nas fases 4 e 5, as restrições de Ca foram libertadas e, finalmente, na fase 6 as restrições de ligações de hidrogénio foram libertadas. A estrutura de cristal da MBP inclui dois átomos Ho^{2+} que ocupam os dois locais de ligação de Ca^{2+} na MBP. A E-selectina retém um local de ligação a Ca^{2+}, mas perde o segundo (ver Resultados). Uma vez que o campo de forças AMBER (Weiner *et al.*, 1984 e 1986, supra) não inclui uma representação para Ca^{2+}, o átomo de Ca^{2+} foi removido e as cadeias laterais que coordenam o Ca^{2+} (E80, N82, E88, N105, D106) foram fixadas ao longo do processo de minimização.

B. *Resultados*

Caracterização de um painel de anticorpos de E-selectina

A fim de facilitar o estudo da estrutura e função da E-selectina, os requerentes produziram um painel de Mabs bloqueadores e não bloqueadores, dirigidos contra E-selectina humana e de coelho (veja-se Procedimento experimental). Verificou-se que três Mab de E-selectinas anti-humanos (7H5, 8E4 e 3B7) inibem a adesão das células HL60 a HUVECs activados por citóquinas e células COS transfectadas com E-selectina (Figura 1A). Estudos de reactividade cruzada demonstraram que estes três "Hats" bloqueadores não reconhecem a E-selectina de coelho (Figura 1B), um resultado que facilitou o mapeamento dos epítopos reconhecidos por estes Mabs (veja-se a seguir). Os Mabs de E-selectina anti-humana comercialmente disponíveis, BBA1, BBA2 e ENA-1, também não tiveram uma reacção cruzada com a E-selectina de coelho (Figura 1B). Apesar de nenhum destes três Mab's comerciais bloquear de forma significativa a aderência de HL60 mediada por E-selectina, no teste de adesão celular (Figura 1A), o BBA2 tinha claramente uma actividade bloqueadora de adesão em testes de adesão celular realizados a baixa temperatura [Pigott *et al.*, J. Immunol. 147, 130-135 (1991); C. Phipps – comunicação pessoal] e verificou-se que a ENAa-1 bloqueia a adesão de neutrófilos a HUVECS activados [Leeuwenberg *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 81 496-500 (1990)]. Além disso, tanto o BBA2 como o ENA-1 inibem eficazmente a ligação de E-selectina ao glicolípido sLex imobilizado (Foxall *et al.*, 1992 supra). Uma vez que o sLex é o principal ligando de hidrato de carbono para a E-selectina na superfície celular do leucócito, parecia provável que a análise de epítopos reconhecidos por este painel de anticorpos bloqueadores (7H5, 8E4, 3B7, BBA2 e ENA-1) viesse a indicar a(s) região(ões) da E-selectina envolvida(s) no reconhecimento de hidratos de carbono e adesão celular resultantes. Além disso, o mapeamento de regiões reconhecidas por outros Mabs não bloqueadores deverá confirmar e enfatizar o(s) local(ais) encontrados para bloquear os anticorpos, indicando as regiões do domínio de lectina não envolvidas com o reconhecimento de hidratos de carbono e adesão celular. Assim, o passo inicial na análise de regiões da E-selectina envolvido nas interacções de hidratos de carbono consistia no mapeamento de epítopos reconhecidos por Mabs anti-E-selectina, bloqueadores e não bloqueadores.

Análise da ligação de anticorpo monoclonal de E-selectina

A estratégia de mutagénese da E-selectina baseou-se em duas considerações principais. A primeira consideração derivada do trabalho anterior sobre a localização do epítopo reconhecido pelo Mab bloqueador de E-selectina de murídeo, Mel 14 [Bowen *et al.*,

J. Cell Biol. 107, 1853-1862 (1990)]. Este trabalho demonstrou que este anticorpo reconhece uma região nos 53 aminoácidos do terminal N da L-selectina de murídeo. Assumiu-se que os anticorpo bloqueadores direccionados contra a E-selectina também podem reconhecer epítopos contidos no terminal-N do domínio de lectina e esta região foi, assim, tornada alvo para mutagénese. Uma segunda estratégia torna alvos os resíduos carregados positivamente no domínio de lectina, utilizando quer protocolos de mutagénese de exploração de alanina, quer mutagénese de espécies homólogas [Cunningham e Wells, Science 244, 1081-1085 (1989)]. O facto de todas as selectinas necessitarem de um ácido siálico carregado negativamente como parte do ligando de hidrato de carbono, juntamente com outras observações, pode ser interpretado como indicando a formação de uma interacção mediada por carga, entre o carboxilato carregado negativamente do ácido siálico e um ou mais resíduos carregados positivamente, no domínio de lectina.

Tal como acima descrito, nenhum dos Mabs bloqueadores de E-selectina anti-humanos reagiram com E-selectina de coelho e a análise das sequências de aminoácidos dos domínios de lectina de E-selectina humana e de coelho mostraram que 5 de 16 diferenças estavam agrupadas nos nove aminoácidos do terminal N (Figura 2A). A fim de determinar se os Mabs bloqueadores são mapeados nesta região, produziu-se uma proteína quimérica contendo lectina de E-selectina de coelho e domínios do tipo egf, em que os 9 aminoácidos do terminal N foram substituídos pela sequência correspondente da E-selectina humana (Hu-Ra1) (veja-se Figura 2B). Esta construção foi produzida como uma fusão dos domínios de lectina e do tipo egf com uma região de CD16 suficiente para permitir a ancoragem da proteína expressa na superfície celular, por meio de uma ligação glicosilfosfato de inositol (Figura 2B). O domínio do tipo egf foi incluído pois os dados anteriores sugeriram que a conformação global dos domínios de lectina da selectina requerem a presença do domínio do tipo egf adjacente. A imunofluorescência indirecta de células COs transfectadas com lectina humana-egf-CD16, lectina de coelho-egf-CD16 ou a quimera humano-coelho (HuRa1) demonstraram que os aminoácidos 1-9 humanos no ambiente de E-selectina de coelho eram suficientes para conferir ligação ao MAb 7H5 e 8E4 mas não ao MAb 3B7 (Figura 3). Em experiências semelhantes, o ENA-1, mas não o BBA2, ligam-se a Hu-Ra1 (não apresentado). Além disso, a adesão de células HL60 a células COS transfectadas com Hu-Ra-1 foi inibida por Mab's7H5 e 8E4, mas não foi afectada pelo MAb 3B7, ou pelo MAb 14G2 não bloqueador (Figura 4). Estes dados eram consistentes com a localização dos epítopos reconhecidos pelos três Mabs bloqueadores (7H5, 8E4 e ENA-1) nos 9 aminoácidos do terminal-N da E-selectina humana.

A fim de facilitar ainda mais a análise de mapeamento dos Mab e permitir estudos de ligação de hidratos de carbono directos (veja-se a seguir), introduziram-se mutações no

domínio de lectina de uma quimera E-selectina-imunoglobulina G humana (IgG) que é semelhante a uma quimera de L-selectina-IgG anteriormente descrita (Figura 2B) (Watson *et al.*, 1990, 1991, supra; Foxall *et al.*, 1992, supra). A quimera de E-selectina-IgG permitiu uma quantificação fácil de cada mutante individual por análise da quantidade de IgG humana produzida a partir de cada teste de transfecção celular transiente (vejam-se os procedimentos experimentais). A inclusão da cauda IgG humana também permitiu uma análise rápida da capacidade de cada mutante se ligar ao painel de anticorpos anti-E-selectina, bem como imobilizar a sLex, utilizando anticorpo anti-IgG marcado. Deste modo, os mutantes que afectaram a estrutura global da lectina (perda de reconhecimento por todos os Mabs), estrutura localizada (perda de reconhecimento por um subconjunto de Mabs) e reconhecimento de hidratos de carbono (perda de reconhecimento de açúcar com retenção do reconhecimento pela maioria dos Mabs) podem facilmente ser diferenciados.

A Figura 5 mostra uma série de mutações que parecem afectar a ligação de vários anticorpos monoclonais à E-selectina. Uma vez que a construção quimérica dos domínios de lectina da E-selectina humana e de coelho (HuRa1) identificou que os nove aminoácidos de terminal-N formam pelo menos parte dos epitopos de três anticorpos bloqueadores (8E4, 7H5 e ENa-1), construíram-se primeiro mais mutantes nesta região, concentrando-se nas cinco posições (resíduos 2, 4, 5, 7 e 9) que diferem entre coelho e humano. Uma quimera de E-selectina humana-IgG em que os resíduos 2, 4, e 5 foram mutados, retém a ligação a todo o painel de anticorpos, indicando que estes aminoácidos não são críticos para a ligação de MAb (dados não apresentados). No entanto, uma mutação que substitui os aminoácidos de E-selectina humana nas posições 7 e 9 pelos seus equivalentes encontrados na sequência de E-selectina de coelho, resulta na perda de ligação dos anticorpos 7H5, 8E4 e ENA-1 (Figura 5A). A perda de ligação destes 3 mAb's corresponde directamente ao ganho de ligação demonstrado com a quimera HuRa-1. Verificou-se que outro mutante de terminal-N, o E8A, elimina a ligação de BBA2 e ENA 1 (Figura 5C). Assim, de acordo com os estudos da quimera humana-coelho acima descritos, os resíduos nas posições 7, 8 e 9 do domínio de lectina da E-selectina, contribuem para o epítopo reconhecido por quatro Mabs bloqueadores anti-E-selectina.

As mutações nas posições 7, 8 e 9 permitiram o mapeamento de todos os anticorpos bloqueadores, excepto para Mab 3B7. A substituição dos resíduos humanos pelos seus equivalentes de coelho noutros locais do domínio de lectina da E-selectina, revelaram que uma mutação dupla nos resíduos 98 e 101 eliminou completamente a ligação deste Mab bloqueador (Figura 5B). De relevância, realizou-se também a experiência inversa, em que os resíduos humanos nestes dois locais (98 e 101) foram colocados no ambiente HuRa-1. Verificou-se que o mutante resultante se liga a Mab 3B7, confirmando assim que este local

continha um epítopo reconhecido por este Mab bloqueador (dados não apresentados). Finalmente, um mutante de E-selectina-IgG, que continha uma substituição de valina por alanina na posição 101, reteve a ligação a Mab 3B7, indicando que o E na posição 98 é um componente essencial do epítopo 3B7.

A complexidade do epítopo reconhecido pelo Mab bloqueador 7H5 é revelada pela mutação K113A (Figura 5C). Esta mutação, que está localizada no terminal-C do domínio de lectina, elimina completamente a ligação deste Mab. Uma vez que a ligação de 7H5 também foi eliminada por duas mutações pontuais no terminal-N do domínio de lectina (posições 7 e 9, Figura 5A), pode-se concluir que o epítopo reconhecido por este anticorpo bloqueador deriva de ambos os terminais N e C. De facto, a perda parcial da ligação de 7H5 que se verifica para as mutações nos resíduos 98 e 101 (Figura 5B) também era consistente com o alinhamento próximo desta região com os locais de terminal N e C reconhecidos por este Mab. Uma interpretação deste resultado é que estas regiões podem estar proximamente alinhadas, na estrutura terciária do domínio de lectina (veja-se a seguir).

A ligação de todos os Mabs não bloqueadores não parece ser grandemente afectada por mutações que rompem o reconhecimento de Mab bloqueador (Figuras 5A-D). Isto era consistente com estas duas classes Mabs que reconhecem locais distantes no domínio de lectina. Por exemplo, o mutante K74A perdeu completamente a ligação de vários destes anticorpos não bloqueadores (9H9, 1B3, 11G5, 4D9 e 1D6) e perdeu parcialmente a ligação de outro (14G2) (Figura 5E). Este mutante não afectou a ligação de quaisquer dos Mabs bloqueadores que os requerentes analisaram, sugerindo que esta região da E-selectina pode não estar directamente envolvida no reconhecimento de hidratos de carbono.

Por último, vários destes mutantes (M10A, Y12A, E14A, I93A, Y94A, I95A, K96A, E98A e M103A) resultaram na perda de ligação de todos os anticorpos no painel anti-E-selectina, incluindo 9A1 e 7E10 que reconhecem determinantes nos domínios do tipo ligação ao complemento 1 e 2 da E-selectina. Este resultado foi obtido, apesar de se terem adicionado quantidades normalizadas destes mutantes, com base na concentração de IgG, aos poços revestidos com anticorpo. Estas mutações parecem ter, portanto, efeitos globais nos domínios de E-selectina recombinantes, e a perda aparente de reactividade de anticorpos monoclonais pode ser devida a desnaturação e/ou degradação.

Reconhecimento de hidratos de carbono por mutantes de E-selectina

Apesar de os dados de mapeamento de Mab bloqueador acima descritos serem consistentes com o envolvimento das regiões de terminal-N e C, bem como da região em

torno dos resíduos 98 e 101 da e selectina, com o reconhecimento de hidratos de carbono, a grande protecção num antigénio como resultado de um anticorpo monoclonal ligado [tipicamente 680-880 A^2 [Jin *et al.*, 1992 supra; Davies e Padlan, Ann. Rev. Biochem. 59, 439-473 (1990)] pode causar o bloqueamento, por impedimento estereoquímico dos locais de reconhecimento de hidratos de carbono, relativamente distantes do epítopo do anticorpo. Assim, os requerentes analisaram a capacidade de vários mutantes de E-selectina-IgG se ligarem ao glicolípido sLex (Kameyama *et al.*, Carbohydrate Res. 209, c1-c4 (1991)] que tinha sido imobilizado em poços de microtítulo de plástico. Este teste foi validado anteriormente (Foxall *et al.*, 1992, supra) e verificou-se que a ligação da quimera de E-selectina-IgG era dependente de cálcio, inibida por Mabs bloqueadores de E-selectina e dependente da presença da forma ácido alfa 2-3 siálico do hidrato de carbono.

Como se pode ver na Figura 6A, obtiveram-se três tipos diferentes de resultados com os vários mutantes analisados. Algumas mutações não afectaram a ligação da E-selectina a sLex imobilizado. Verificou-se que estas mutações eram do tipo que, ou não afecta a ligação de qualquer anticorpo monoclonal (mutantes K32A, K67A e R84A, K86A), ou afecta a ligação apenas de anticorpos não bloqueadores (mutante K74A). Este resultado era consistente com a possibilidade, anteriormente mencionada, de esta região da E-selectina não estar envolvida com o reconhecimento de hidratos de carbono. Outro tipo de efeito é exemplificado pelas mutações nas posições R97, K99 e K113. A conversão de qualquer destes locais a alanina, quer completamente (R97 e K113), quer quase completamente (K99), eliminou a ligação da E-selectina a sLex. Apesar de se verificar que as mutações em R97 e K99 não têm efeito na ligação de anticorpos bloqueadores, verificou-se que a mutação em K113 elimina completamente a ligação do anticorpo bloqueador 7H5 (veja-se acima). Além disso, a mutação nos locais 98 e 101, adjacente a R97 e K99, eliminou a ligação de outro Mab bloqueador, 3B7. Estes resultados unificaram as localizações dos locais de ligação dos Mab bloqueadores com resíduos que eram críticos para o reconhecimento de hidratos de carbono e eram consistentes com o envolvimento directo destas regiões de E-selectina com a ligação de hidratos de carbono. O efeito final, de algum modo inesperado, da mutação de E-selectina na ligação de sLex foi exemplificado pelo mutante E8A. A Figura 6A mostra que este mutante parece apresentar uma ligação melhorada a sLex, quando se adiciona o mutante a poços, na mesma concentração que a quimera de E-selectina do tipo selvagem. Uma curva dose-resposta que compara o mutante E8A com a E-selectina do tipo selvagem (Figura 6B) revela que o mutante se liga ~5 vezes mais avidamente ao sLex do que o tipo selvagem. Esta ligação melhorada pelo mutante E8A era completamente dependente de cálcio e não ocorreu na forma de ácido alfa 2-6 siálico, inactiva, do hidrato de carbono (dados não apresentados). Como descrito anteriormente, as mutações nesta região (*i.e.* nos resíduos 7, 8 e 9) afecta profundamente a ligação de vários Mabs bloqueadores. Assim, é possível que esta região de

E-selectina também desempenhe uma papel crítico no reconhecimento de hidratos de carbono.

Modelo de E-selectina

Apesar de os resultados acima descritos permitirem várias conclusões importantes acerca das regiões da sequência linear de E-selectina envolvidas no reconhecimento de hidratos de carbono, a sua relevância seria melhorada se pudessem ser aplicadas a um modelo estrutural do domínio de lectina desta proteína. Na ausência de dados cristalográficos, pode-se construir um modelo tridimensional de uma molécula, utilizando coordenadas estruturais de moléculas relacionadas [Greer, J. Mol. Biol. 153, 1027-1042 (1981)]. Recentemente, determinou-se a estrutura de raios-X da proteína de ligação à manose (MBP), uma lectina tipo C que é homóloga ao domínio de lectina da E-selectina (Weis *et al.*, 1991, supra). De modo a melhor compreender a importância relativa das mutações funcionais acima descritas, os requerentes utilizaram estes dados estruturais para desenvolver um modelo do domínio de lectina da E-selectina.

A derivação do modelo de lectina da E-selectina a partir das coordenadas de MBP baseou-se na estrutura secundária comum a ambos, incluindo 78 resíduos (de 121) de E-selectina (Weis *et al.*, 1991, supra) (Figura 7). Foram analisados três modelos de E-selectina, que diferem apenas na conformação de duas dobras de superfície: S43-Y48 e Y94-D100, correspondentes a K152-S154 e V199-D200 de MBP, respectivamente. A dobra S43-Y48 contém uma inserção de três resíduos relativamente a MBP, enquanto que a dobra Y94-D100 contém uma inserção de cinco resíduos. O modelo de E-selectina antes da minimização de energia tinha um desvio de raiz quadrada média (r.s.m) de 0,17Å (78 átomos de Ca), enquanto que o do melhor modelo de energia minimizada era de 0,68Å. Para fins de comparação, os requerentes submeteram também a estrutura de cristal de MBP ao mesmo regime de minimização de energia utilizado para o modelo de E-selectina. A MBP minimizado (apenas a molécula 1) apresentava um desvio r.s.m de Ca de 0,45Å (resíduos K110-C217, *i.e.* excluindo sete resíduos do terminal-N e C) *versus* estrutura de cristal. Assim, o regime de minimização de energia manteve a estruturas secundária do modelo de E-selectina; isto foi conseguido restringindo inicialmente a estrutura secundária dos átomos de Ca e as ligações de hidrogénio durante a minimização.

Weis (Weis *et al.*, 1991, supra) observou a presença de núcleos hidrófobos pequenos e grandes na MBP, que eram críticos para a estrutura global. Para o pequeno núcleo, apenas dois dos seis resíduos são conservados na E-selectina (G52, A115), embora o modelo possa acomodar as outras quatro cadeias laterais de E-selectina, sem perturbar a conformação da

proteína. No núcleo grande apenas seis dos catorze resíduos são conservados. Uma das substituições, A155(MBP) para Y49(E-selectina), necessitava de mover uma a-hélice-2 (K32-L42) ligeiramente para longe do centro da proteína, de modo a acomodar a introdução da cadeia lateral de Y49. Esta cadeia lateral de Y49 interage com as duas dobras S43-Y49 e Y94-D100, acima mencionadas. Na extremidade oposta (terminal-N) da hélice, a substituição de P138(MBP) por 129 (E-selectina) também contribuiu para o ligeiro desvio na a-hélice-2. Assim, as substituições na E-selectina no grande núcleo hidrófobo preenchem o espaço interno criado pelo ligeiro desvio da a-hélice-2. Assim, o número relativamente elevado de alterações de aminoácidos nas regiões do núcleo hidrófobo de MBP e o domínio de lectina da E-selectina puderam ser acomodados pelo modelo.

A estrutura de cristal de MBP contém dois locais de ligação a Ca^{2+} putativos que, na estrutura de cristal, são ocupados por dois iões Ho^{2+}. Como referido por Weis, supra, o local 2 é mantido na E-selectina: E80 Oe2, N82 Od1, E88 Oe2, N105 Od1, D106 Od2, oxigénio do carbonilo do esqueleto de D106 e uma molécula de água coordena este Ca^{2+}. O outro local de ligação ao Ca^{2+} não está provavelmente presente na E-selectina, o que também foi referido anteriormente (Figura 7). Apesar de o D89 (D194 em MBP) ser conservado na E-selectina, o D161 na MBP é substituído por K55 na E-selectina e duas outras cadeias laterais que coordenam o local 1 Ca^{2+} da MBP, *i.e.* E165 e D188, são substituídas por N57 e N83 na E-selectina. Apesar de a cadeia lateral de Asn poder ainda coordenar um Ca^{2+} através do seu átomo Od1, o N57 é adjacente a uma eliminação de dois resíduos, cuja dobra da qual faz parte, altera provavelmente a conformação. De igual modo, o N83 é parte de uma dobra que tem uma conformação proposta na E-selectina diferente da de MBP. Embora esta dobra não contenha inserções nem eliminações, a sequência HGSG de MBP forma uma volta inversa do tipo II', em que a Gly na posição 4 tem uma conformação de esqueleto apenas possível para a Gly (136°, 148°). A sequência RQKD de E-selectina necessitava de uma conformação de dobra diferente, devido às substituições de G para Q e de G para D. Assim, parece existir apenas um local de ligação a cálcio no domínio de lectina da E-selectina.

Como é evidente, o aspecto mais interessante do modelo é a localização das cadeias laterais de aminoácido, cuja mutação parece afectar a ligação de anticorpos monoclonais e/ou o reconhecimento de sLex. Como se pode ver a partir do modelo (Figura 7), os resíduos de aminoácido envolvidos no reconhecimento de Mab bloqueadores parecem formar um retalho na superfície do domínio de lectina, próximo da folha beta anti-paralela, formada pelos terminais N e C ligados por dissulfureto e pela dobra adjacente ligada por dissulfureto, formada pelas duas cisteínas internas. Assim, verifica-se que as cadeias laterais de aminoácidos nas posições 7, 8, 9, 98, 101 e 113, as quais afectaram a ligação de vários Mabs bloqueadores, estão todas muito próximas umas das outras na superfície de E-selectina

(dentro de um retalho de -80 angstroms quadrados). De importância particular, era o alinhamento próximo das cadeias laterais dos resíduos 7, 9 e 113 que era consistente com o efeito das mutações nestes resíduos na ligação do Mab bloqueador 7H5. O efeito parcial das mutações nos resíduos 98 e 101 na ligação de 7H5 também é consistente com o modelo, uma vez que a dobra ligada por dissulfureto que continha estes resíduos também está próxima dos resíduos 7, 8, 9 e 113. O modelo revela também que a cadeia lateral reconhecida pelos anticorpo não bloqueadores (K74) se encontra num lado do domínio de lectina oposto ao que parece ligar os anticorpos bloqueadores (Figura 7). Este resultado é consistente com a hipótese de a região reconhecida por anticorpos não bloqueadores estar a uma distância considerável do local de reconhecimento de hidratos de carbono Assim, o modelo de E-selectina sugere que um retalho relativamente pequeno da molécula reconhecido pelos anticorpos monoclonais bloqueadores, parece estar envolvido com o reconhecimento de hidratos de carbono.

A avaliação da localização de aminoácidos que se verificou estarem envolvidos com a ligação de sLex é consistente com a interpretação de que a região reconhecida pelos anticorpos monoclonais bloqueadores está envolvida no reconhecimento de hidratos de carbono. O espaçamento próximo do resíduo E8, cuja mutação se verificou aumentar a ligação a sLex, e o resíduo K113, cuja mutação se verificou eliminar a ligação de hidratos de carbono, pode ser claramente observada no modelo. Talvez de maior interesse seja a proximidade estreita de outras duas mutações que inibem completamente, ou quase completamente o reconhecimento de sLex. Como se pode ver pelo modelo da Figura 7, o resíduo R97, cuja mutação elimina virtualmente o reconhecimento de sLex, encontra-se muito perto do local K113, cuja mutação também aboliu a ligação de sLex. Também se verificou que a mutação de K99, que também apresentou um efeito negativo profundo na ligação de sLex, está próxima desta região. A mutação de outro resíduo na mesma dobra (D100) não teve efeito na ligação de sLex (Figura 6A). Estes resultados são consistentes com o reconhecimento do sLex por uma região relativamente pequena do domínio de lectina da E-selectina, compreendida por resíduos dos terminais N e C e pela dobra pequena ligada por dissulfureto. Além disso, também sugerem um papel para pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido carregada positivamente (R97, K99 ou K113), no reconhecimento deste ligando de hidrato de carbono. Finalmente, o modelo apresentado na Figura 7 demonstra que várias cadeias laterais cuja mutação não afectou a ligação de sLex, estão localizadas num lado da molécula que está bastante distante do local aparente de ligação de sLex.

C. *Discussão*

Os dados anteriores fornecem informações preciosas acerca das interacções entre a E-selectina e o seu ligando de hidrato de carbono, o sLex. O trabalho descrito neste exemplo é único, na medida em que combina o mapeamento dos locais de ligação de anticorpo monoclonais bloqueadores e não bloqueadores, com a capacidade de um dado mutante de E-selectina se ligar ao seu ligando hidrato de carbono natural, o sLex. A concordância entre os dados de mapeamento de Mab bloqueadores e a localização de mutações que afectam a ligação de sLex é consistente com a hipótese de a pequena região do domínio de lectina da E-selectina aqui identificada, estar directamente envolvida com a ligação à face anteriormente definida de sLex (Tyrrell *et al.*, 1991, supra; Berg *et al.*, supra). Esta proposta é também suportada pelo facto de muitos anticorpos monoclonais não bloqueadores parecerem estar localizados no lado oposto ao do domínio de lectina.

Um dos aspectos mais interessantes da mutagénese aqui descrita é a descoberta de que dois resíduos positivamente carregados (R97 e K113) que são críticos para o reconhecimento de sLex, parecem estar muito próximos um do outro no modelo de E-selectina (Figura 7). Uma suposição principal da análise mutagénica baseou-se na importância potencial de resíduos carregados positivamente e a verificação de que a eliminação de qualquer destas cadeias laterais tem efeitos negativos no reconhecimento de hidratos de carbono suporta a possibilidade de as cadeias laterais carregadas positivamente nos domínios de lectina da E-selectina estarem envolvidas no reconhecimento de hidratos de carbono (Stoolman *et al.*, supra; Yednock *et al.*, 1987, supra; Lasky *et al.*, 1989). Um modo possível pelo qual este reconhecimento pode ser realizado é através da interacção de cargas entre estas cadeias laterais e o grupo carboxilato do resíduo de ácido siálico, encontrado no sLex. A importância do grupo carboxilato na ligação de sLex é sublinhada por estudos de síntese orgânica, que revelaram que um composto do tipo sLex com apenas um grupo de ácido carboxílico no local de ácido siálico, pode ser eficazmente reconhecido pela E-selectina (J. Musser e B. Brandley - observações não publicadas). Assim, parece possível que algum tipo de interacção mediada por carga possa estar envolvida com a adesão de sLex à E-selectina. Todas as três selectinas parecem necessitar de ácido siálico para adesão e é interessante notar que enquanto que o K113 se encontra em todas as três, seleccionadas de várias espécies diferentes, encontra-se um resíduo carregado positivamente (R) na posição 97 apenas da L- e E-selectina, enquanto que a P-selectina humana contém um S neste local. A conservação de um K na posição 113 de todas as selectinas, juntamente com a análise de mutagénese aqui descrita, é consistente com o papel directo deste resíduo no reconhecimento do ácido siálico, talvez por formação de uma ponte salina ou ligação de hidrogénio. A conservação menos restrita entre as selectinas, da posição 97, sugere que este resíduo,

embora claramente envolvido no reconhecimento de hidratos de carbono, pode ter um efeito menos directo na ligação do açúcar do que o resíduo K113. É interessante notar que a mutação de D100 para alanina não apresentou nenhum efeito na ligação de sLex, o que é consistente com a suposição de que apenas os resíduos carregados positivamente nesta área, estão envolvidos com o reconhecimento de sLex.

Os dados aqui descritos também proporcionam uma forte evidência do envolvimento do terminal-N da E-selectina na ligação de hidratos de carbono. A mutagénese do terminal-N foi inicialmente inspirada por dados anteriores que demonstraram que o Mab bloqueador de L-selectina anti-murídeo, o Mel 14, parece estar localizado no terminal-N desta glicoproteína. Em concordância com esse estudo, verificou-se que vários anticorpos monoclonais bloqueadores anti-E-selectina também reconhecem resíduos no terminal-N desta glicoproteína. De facto, dos cinco anticorpos bloqueadores analisados, verificou-se directamente que quatro (BBA 2, ENA 1, 8E4 e 7H5) se ligam a esta região da E-selectina, o que é consistente com o papel importante deste local, no reconhecimento de hidratos de carbono. A verificação de um resíduo (E8) nesta região, cuja mutação para A aumentou a ligação de hidratos de carbono também era consistente com o envolvimento deste local no reconhecimento de sLex. Além disso, o reconhecimento melhorado de sLex por mutação na posição 8 pode ter importância biológica. Como referido anteriormente, as selectinas parecem mediar uma adesão do tipo "rolamento" de afinidade relativamente baixa, como um precursor de uma adesão mais firme, mediada por integrinas de leucócitos (Butcher, 1991, supra; Lawrence e Springer 1991, supra; Ley *et al.*, 1991, supra; Von Adrian *et al.*, 1991, supra). É possível que a região de terminal-N da E-selectina tenha evoluído para decrescer a afinidade relativa do reconhecimento de hidratos de carbono, por incorporação de um resíduo carregado neste local. É interessante notar que as outras duas selectinas (L- e P-) contêm uma carga positiva neste local (K) e a mutação da K- e L-selectina para uma A também parece aumentar de modo semelhante o reconhecimento de sLex, em 5 a 10 vezes (veja-se Exemplo 2). Parece assim possível que a carga neste local possa servir para diminuir a afinidade da ligação de hidratos de carbono, o que é consistente com a forte associação do hidrato de carbono com esta região.

Apesar de os resíduos aqui delineados poderem estar directamente envolvidos com o reconhecimento de sLex, os efeitos indirectos podem também desempenhar um papel na perda de ligação por alguns destes mutantes. Por exemplo, a mutação do resíduo K99 para alanina, decresceu parcialmente o reconhecimento de sLex pela E-selectina. Este resíduo estava relativamente distante das mutações R97A e K113A, proximamente opostas, que afectam profundamente a ligação de sLex, o que é consistente com a possibilidade de a mutação K99A poder afectar a ligação de sLex por um mecanismo indirecto. Um efeito

indirecto deste tipo resultaria se a mutação de K99 para A alterasse a conformação desta dobra, de um modo tal que o R97 não mais formasse um contacto estável com o hidrato de carbono. Outro efeito indirecto pode envolver interacções entre os domínios do tipo egf e de lectina. Os dados anteriores mostraram claramente, em ambas as moléculas de adesão de L- e E-selectina, que a remoção do domínio do tipo egf resulta na perda de reconhecimento de epítopos pelos anticorpos direccionados contra o domínio de lectina (Bowen *et al.*, 1990, supra; Walz *et al.*, 1990, supra). Estes resultados eram consistentes com a possibilidade de um papel para o domínio egf ser a mediação da estrutura do domínio de lectina, talvez por contacto íntimo entre resíduos em cada um destes motivos. É portanto possível que a perda de ligação por um ou mais dos mutantes aqui descritos possa ser devida a um nível menor de interacção entre os domínios de lectina e do tipo egf. No entanto, deve ser enfatizado que os estudos de cristalografia de mutantes pontuais noutras proteínas apresentam diferenças estruturais que serão altamente localizadas (Jin *et al.*, 1992 supra; Wells 1991, supra e referências nele contidas). Adicionalmente, deve notar-se que a retenção de ligação pelos anticorpos monoclonais específicos de lectina a mutantes R97A e K99A não é consistente com a ruptura principal da estrutura do domínio de lectina que se pode esperar por inibição de algumas interacções entre os domínios de lectina e do tipo egf (Bowen *et al.*, 1990, supra; Walz *et al.*, 1990, supra).

Recentemente, Geng e colaboradores mostraram que um mAb capaz de inibir a ligação de neutrófilos à P-selectina localizado nos resíduos 19-34 desta molécula e que um péptido correspondente a esta extensão também inibe a ligação de neutrófilos à P-selectina (Geng *et al.*, 1991, supra). No modelo da E-selectina aqui apresentado, os resíduos 19-34 formam uma dobra que está do lado oposto ao local onde o sLex se parece ligar. Os dois mutantes produzidos nesta sequência na E-selectina, ou não afectaram a ligação de sLex ou mAb (mutante K32A) ou resultaram numa proteína com a conformação errada (mutantes Y18A, Q20A, R22A). Assim, embora não tenha sido realizada uma análise mutacional extensa desta dobra, os dados dos requerentes não são consistentes com o seu envolvimento directo no reconhecimento de hidratos de carbono pela E-selectina.

Além das mutações acima descritas, verificou-se que outra substituição, a N82D, no domínio de lectina da E-selectina afecta drasticamente o reconhecimento de sLex. Os resultados da captura de anticorpos e os estudos da ligação de 2'3 sLex são apresentados na Figura 13. Embora esta substituição não afecte a ligação de qualquer dos mAb's (A), eliminou completamente a ligação de E-selectina a 2'3 sLex (B). Pensa-se que a asparagina na posição 82 participa na quelatação de Ca^{2+} através da molécula Oδ1. Não seria previsível, *a priori*, que a remoção do grupo amino desta asparagina, na substituição N82D, rompesse esta interacção. No entanto, pensou-se que era possível que o mutante N82D tivesse perdido

a ligação ao ligando, devido a uma menor afinidade para o cálcio. Para testar esta possibilidade, o mutante N82D foi testado quanto à ligação de 2'3 sLex na presença de cálcio adicionado. Tal como se observa na Figura 13 (C), o mutante NB2D não se ligou ao sLex, mesmo a concentrações de cálcio tão elevadas como 40 mM. Assim, a perda de ligação por este mutante de E-selectina não é provavelmente devida a uma perda da quelatação do cálcio pelo domínio de lectina. Pelo contrário, os resultados implicam um papel para o grupo amino terminal de asparagina na posição 82 do domínio de lectina da E-selectina no reconhecimento do ligando pela E-selectina.

EXEMPLO 2

Prepararam-se quimeras de L-selectina-IgG de murídeo essencialmente como descrito no Exemplo 1 para a E-selectina. A lisina (K), na posição de aminoácido 8 da L-selectina foi substituída por alanina (A), de acordo com o método de Kunkel *et al.*, 1987 supra, utilizando o kit de mutagénese *in vitro* Muta-Gene Phagemid (BioRad), seguindo as instruções do fabricante. O mutante correcto foi confirmado por sequenciação de ADN e a quimera mutante foi expressa de forma transiente e secretada por transfecção de células 293, de rim embriónico humano (Watson *et al.*, 1991 supra). A concentração da quimera foi quantificada por ELISA, utilizando um mAb de ratinho específico de IgG1-Fc, anti-humano, como descrito por Watson *et al.*, 1991, supra). O teste de ligação de sialilo Lewis X foi realizado essencialmente como descrito no Exemplo 1. Os resultados são apresentados na Figura 8.

EXEMPLO 3

A. *Procedimentos experimentais*

Teste de citometria de fluxo para o ligando de P-selectina

A interacção da P-selectina e do seu ligando celular foi estudada utilizando um teste de citometria de fluxo. As células utilizadas neste teste eram ou células HL60 (mantidas em MEM da Dulbecco com glucose elevada, mais 10% de FBS da Hyclone), ou neutrófilos humanos frescos. Os neutrófilos humanos foram purificados a partir de sangue periférico heparinizado, por meio de um gradiente de Ficoll-Hypaque para remover as células mononucleares, seguido de tratamento com sulfato de dextrano a 3%, para remover os glóbulos vermelhos. As células resultantes eram >90% neutrófilos. Antes da coloração com P-selectina-IgG, ambos os tipos de células foram pré-incubados em PBS da Dulbecco/1% de albumina de soro bovino/0,1% de azida de sódio/1% de soro de coelho normal (meio de

coloração), durante 30-60 sans, em gelo. Após esta incubação inicial, adicionou-se 1 μg de P-selectina-IgG a alíquotas de 100 μl de 10^6 células e incubou-se durante 30-60 minutos em gelo. As células foram lavadas a seguir com meio de coloração e resuspensas em 100 μl de meio de coloração, ao qual se adicionaram 2 μl de uma IgG (específica de Fc) de cabra $F(ab')_2$ anti-humana, conjugada com ficoeritrina. As células foram incubadas durante 15-30 minutos em gelo, lavadas duas vezes com meio de coloração e resuspensas em 0,5 ml de meio de coloração, antes da análise por citometria de fluxo num FACScan (Becton-Dickinson). Para determinar que a coloração era uma interacção da P-selectina com o seu ligando, a coloração foi também realizada na presença de 10 mM de EGTA. A fim de determinar a sensibilidade da protease e a necessidade de ácido siálico para esta interacção, incubaram-se as células HL60 em D-PBS e 1% de BSA, ou com tripsina, ou com sialidases de Arthrobacter ou Clostridium, a 37°C, antes de resuspender em meio de coloração. A fim de determinar o efeito da activação na expressão do ligando, incubaram-se os neutrófilos humanos a 37°C com 50 ng/ml de acetato de forbol miristato, durante 10 min, antes de resuspender em meio de coloração. A fim de avaliar a capacidade de vários hidratos de carbono inibirem a coloração, adicionaram-se reagentes às células imediatamente antes da adição da quimera de P-selectina e estes estavam presentes até as células serem lavadas, antes da adição do anticorpo da segunda fase. Surgiu uma complicação potencial neste teste, resultante da utilização de quimeras de selectina-IgG para corar células (células HL60 e neutrófilos) que transportam receptores Fc de IgG humana (FcgR, Fanger, M.W., Immunol. Today 10: 92-99 (1989)). A adição de IgG de coelho (na forma de soro de coelho normal) ao meio teste, bloqueou esta ligação na maioria dos casos. No entanto, nalgumas experiências com neutrófilos humanos, era necessário adicionar mAb's de murídeo a FcgR humano (Medarex, Inc. West Lebanon, NH) ao meio de teste, para bloquear completamente esta interacção.

Anticorpos monoclonais anti-selectina

Adquiriram-se os anticorpos monoclonais de P-selectina anti-humanos seguintes, para caracterizar as quimeras mutantes: mAb's AK-6 (CLB-tromb/6) e CRC81 da BioDesign International (Kennebunkport, ME) e mAb AC 1,2 da Becton Dickinson (San Jose, CA). Os mAb's anti-E-selectina 9A1, 7E10, 3B7 e 9H9 foram descritos no Exemplo 1.

Construção e expressão de quimeras do tipo selvagem e mutantes

A produção e caracterização de quimeras de P-selectina-IgG e E-selectina-IgG foi anteriormente descrita (Asa, D. *et al.*, J. Cell Biol. 117:895-902 (1992)). A quimera PE-1 foi construída em duas fases. Primeiro, removeu-se um fragmento EcoRI-XhoI que codifica

para o péptido sinal, o domínio de lectina e parte do domínio EGF da P-selectina, a partir de um plasmídeo pRK5/P-selectina-IgG. O pRK5 é descrito na EP 307,247 publicada em 15 de Março de 1989. Este fragmento foi inserido num plasmídeo pRK5/E-selectina-IgG que tinha sido digerido com EcoRI e BglII, para remover o péptido sinal de E-selectina e a maioria do domínio de lectina de E-selectina. Em segundo lugar, o domínio de lectina da P-selectina foi ligado em sequência com o domínio EGF da E-selectina, através de mutagénese de eliminação direccionada por oligonucleótidos, utilizando o método de Kunkel (Kunkel, T.A. *et al.*, Methods in Enzymol. 154:367-382 (1987)), como descrito no Exemplo 1. A construção PE-1 expressa consistia de um péptido sinal e domínio de lectina da P-selectina, seguido dos domínio EGF, CR1 e CR2 da E-selectina e pela junta IgG2, domínios CH2 e CH3 de ambas as construções de P-selectina-IgG e E-selectina-IgG.

As substituições de aminoácidos foram introduzidas no domínio de lectina da quimera de P-selectina-IgG, como descrito no Exemplo 1. As quimeras do tipo selvagem e mutantes foram expressas e secretadas pelas células 293, quantificadas e testadas quanto à reactividade com mAb anti-selectina, também como descrito no Exemplo 1. As quimeras mutantes são definidas utilizando a nomenclatura: K113A é um mutante em que a lisina (K) na posição 113 é substituída por uma alanina (A).

Ligação de quimeras de selectina-IgG a sialilo Lewis X e sulfatidos

Realizaram-se testes de ligação de diferentes quimeras de selectina-IgG a glicolípidos sLex ou sulfatidos imobilizados, como descrito (Asa, D *et al.*, supra). Em resumo, secaram-se glicolípidos 2'3 sLex, 2'6 sLex ou sulfatidos de cérebro de bovino (Sigma, st. Louis, MO) em poços de microtítulo, lavou-se com água destilada e em seguida bloqueou-se com BSA. A Fc de IgG de cabra anti-humana, biotinilada e estreptavidina-fosfatase alcalina (Caltag, São Francisco do Sul, CA) foram diluídas, cada, a 1:1000 em sobrenadante de células 293, contendo concentrações iguais de quimeras do tipo selvagem ou mutantes e deixou-se formar um complexo antes da adição aos poços. Estes sobrenadantes foram então incubados nas superfícies revestidas com glicolípido sLex ou sulfatido, seguido de lavagem, adição de substrato (p-nitrofenilfosfato) e medição da D.O. a 405 nm.

Produção de um modelo do domínio de lectina da P-selectina

Produziu-se um modelo do domínio de lectina de P-selectina, com base na estrutura de cristal da proteína de ligação à manose (MBP) (Drickamer, K. *et al.*, Science 254: 1608-1615 (1991)) como anteriormente descrito para um modelo de lectina de E-selectina

(Brandley, B.K. *et al.*, Supra). Em resumo, os resíduos MBP foram alterados para a sequência de P-selectina, mantendo as conformações de cadeia lateral semelhantes às de MBP, quando possível. Caso contrário, as conformações das cadeias laterais basearam-se em bibliotecas de rotâmeros (Ponder, J. W. e Richards, F.M., J. Mol. Biol., 193: 775-791 (1987)), considerações de empacotamento e ligações de hidrogénio. As estruturas de dobra possíveis para as onze inserções e duas eliminações na P-selectina, em relação ao MBP, foram apuradas a partir de uma pesquisa das estruturas de cristal na base de dados de proteínas (Bernstein, P.C. *et al.*, J. Mol. Biol. 112: 535-542 (1977)). Finalmente, o modelo de P-selectina foi submetido a ciclos repetidos de minimização de energia, utilizando o método descrito para a E-selectina (Brandley, B.K. *et al.*, supra).

Resultados

Como ponto de partida para avaliar os resíduos na P-selectina responsáveis pela ligação do ligando, os requerentes desenvolveram um teste de citometria de fluxo utilizando a quimera de P-selectina-IgG para corar as células HL60 e neutrófilos. Apesar de a E-selectina-IgG não se ligar a célula HL60 ou neutrófilos neste teste, a coloração da P-selectina-IgG resultou num desvio de fluorescência forte, para ambos os tipos de células (Figura 10, A e B). Esta ligação foi inibida por EGTA, reflectindo a necessidade de cálcio para a interacção de P-selectina com o seu ligando. Outros controlos indicam que este teste, utilizando a quimera de P-selectina-IgG, reflecte as características publicadas da ligação de P-selectina/ligando. Em particular, o tratamento de células HL60, quer com tripsina, quer com sialidase eliminou a coloração (Figura 10C). Além disso, a coloração de P-selectina foi inibida por sulfato de dextrano e manose-1-fosfato, mas não por fucoidina ou manose-6-fosfato (Figura 10C). Após activação de neutrófilos humanos com PMA, embora a expressão de superfície da L-selectina tenha decrescido e a expressão à superfície de CD11/18 tenha aumentado, a expressão à superfície do ligando de P-selectina não se alterou (Figura 10D). Além dos neutrófilos, os monócitos e células NK/LGL eram positivas quando coradas com P-selectina-IgG (dados não apresentados), o que é consistente com a expressão do ligando de P-selectina nestas células.

Como referido acima, a quimera de E-selectina-IgG não se ligou a célula HL60 ou neutrófilos no teste FACS solúvel. Os requerentes exploraram esta descoberta para ajudar a mapear a região da P-selectina necessária para conferir esta ligação de alta afinidade. Uma vez que o estudo dos requerentes com a E-selectina tinha localizado o seu local de ligação ao ligando numa região do domínio de lectina, os requerentes pensaram determinar se as diferenças aparentes na ligação da E- e P-selectina poderiam ser atribuídas a diferenças nos seus domínios de lectina. Consequentemente, os requerentes construíram uma quimera

(PE-1) que consistia de E-selectina-IgG, sendo o domínio de lectina da E-selectina substituído pelo domínio de lectina da P-selectina. Para verificar se esta quimera estava com a conformação correcta, os requerentes testaram a sua ligação a anticorpos específicos para os vários domínios da E- e P-selectina. A quimera PE-1 reagiu bem com anticorpos contra os domínios CR1 e CR2 da E-selectina (mAb's 9A1 e 7E10, Tabela I), mas não com anticorpos contra o domínio de lectina da E-selectina (mAb's 3B7 e 9H9, tabela I). O PE-1 ligou-se ao anticorpo bloqueador contra a P-selectina (De Bruijni-Admiraal, L.G., *et al.*, Blood 80: 134-142 (1992)) (AK-6, Tabela 1), o que é consistente com a localização do epítopo reconhecido por este mAb no domínio de lectina da P-selectina. Pelo contrário, os anticorpos não bloqueadores contra a P-selectina, AC 1,2 e CRC 81 não reconheceram o PE-1 (Tabela 1). Este último resultado é consistente com estudos anteriores que indicam uma contribuição dos resíduos nos domínios de EGF e/ou CRC da P-selectina na ligação de Ac 1,2 (Jutila, M.A. *et al.*, J. Exp. Med. 175: 1565-1573 (1992)). Estes resultados são consistentes com o facto de a quimera PE-1 ter a conformação correcta e indicam que pelo menos parte do epítopo reconhecido pelo mAb bloqueador AK-6 está localizado no domínio de lectina da P-selectina.

A fim de determinar se a transferência do domínio de lectina da P-selectina para a E-selectina-IgG transferiu especificidade para hidratos de carbono, os requerentes analisaram a ligação de PE-1 a vários glicolípidos imobilizados. Esta ligação foi comparada com a observada quer com a P-selectina-IgG, quer com a E-selectina-IgG. Como se pode ver na Figura 11, a quimera PE-1 parece mimetizar a P-selectina-IgG, ao ligar-se a todos os três glicolípidos testados: 2'3 sLex (Figura 11A), 2'6 sLex (Figura 11B) e sulfatidos (Figura 11C). Assim, o domínio de lectina da P-selectina parece ser suficiente para transferir especificidade na ligação a estes glicolípidos purificados.

Os requerentes testaram então a quimera PE-1 quanto à coloração de células, para ver se o domínio de lectina da P-selectina poderia também conferir uma afinidade de ligação elevada ao ligando de P-selectina em células HL60. Como se observa na Figura 12, a quimera PE-1 ligou-se, de facto, a célula HL60. No entanto, o desvio de fluorescência observado com a coloração de PE-1 não era tão grande como o observado com a P-selectina-IgG (Figura 12). Assim, embora o domínio de lectina da P-selectina pareça conferir claramente a coloração de células HL60, poderá ser necessária alguma contribuição do domínio EGF e/ou CR1 da P-selectina para uma ligação completa, de alta afinidade, a estas células. Observaram-se resultados semelhantes quando os neutrófilos foram corados com estas três quimeras (dados não apresentados).

Os resultados acima, utilizando a quimera PE-1, indicam que o domínio de lectina da P-selectina continha elementos responsáveis pelas diferenças na ligação da E- e P-selectina a glicolípidos imobilizados e células. Assim, os requerentes realizaram mutagénese do domínio de P-selectina, para localizar melhor os resíduos responsáveis pela interacção da P-selectina com o seu ligando. A mutagénese da P-selectina focou-se nos locais que em estudos anteriores dos requerentes mostraram ser importantes para a ligação da E-selectina ao seu ligando. Esta estratégia foi seguida por dois motivos. Primeiro, como acima mencionado, existem evidências experimentais que indicam semelhanças no reconhecimento de açúcares pela B- e P-selectina. Assim, é razoável supor que um local importante para a adesão mediada por E-selectina irá também participar na ligação mediada pela P-selectina. A segunda razão deriva de uma consideração experimental. No estudo da E-selectina, os requerentes conseguiram produzir um painel completo de anticorpos, para servir como controlos estruturais para os efeitos de mutações pontuais na estrutura do domínio de lectina. Isto permitiu a eliminação de substituições de aminoácidos que afectam grandemente a conformação do domínio de lectina da E-selectina. Neste estudo, os requerentes estavam limitados apenas a três mAb's anti-P-selectina (AK-6, AC 12, CRC 81), em que apenas um deles (AK-6) mostrou claramente ligar-se a um determinante no domínio de lectina (veja-se acima). A fim de evitar a produção e análise de mutantes que não se ligam ao ligando, devido a um grande efeito conformacional, em vez de a uma substituição específica da cadeia lateral, os requerentes restringiram a análise apenas às mutações que resultaram em proteínas com a conformação correcta, na análise da E-selectina (Exemplo 1).

Como ponto de partida para a mutagénese da P-selectina, os requerentes produziram um modelo tridimensional do domínio de lectina da P-selectina, do mesmo modo que foi gerado o modelo de E-selectina. A comparação dos dois modelos revelou que de entre os resíduos que pareciam mais importantes para a ligação de E-selectina a 2'3 sLex, três são conservados na P-selectina: Y48, K111 e K113. Na E-selectina, as substituições Y48F, K111A e K113A decrescem profundamente a ligação de sLex. A mutação na posição 84 de R para A não afectou a ligação de sLex pela E-selectina e a mutação na posição 8 de E para A aumentou a ligação de sLex pela E-selectina. A Figura 14 mostra o efeito de substituições complementares nestas posições na P-selectina na ligação de mAb's anti-P-selectina. Apesar de nenhuma destas substituições afectar significativamente a captura pelos anticorpos não bloqueadores (AC 1,2 e CRC 81), cada uma das substituições K8A, K111A e K113A decresceu parcialmente a ligação do anticorpo bloqueador AK-6 (Figura 14). Estes resultados são consistentes com os resultados da quimera PE-1 acima, que localizam parte do epítopo de AK-6 no domínio de lectina da P-selectina. Estes resultados são também consistentes com o alinhamento relativamente próximo destas três posições, ao longo da mesma face do domínio de lectina da P-selectina. Além disso, as substituições

complementares K8A e K113A na E-selectina eliminaram completamente a ligação de vários mAb's bloqueadores à E-selectina. Tal como na E-selectina, a mutação dos resíduos nas posições 48 e 84 na P-selectina não afectaram a ligação de mAb (Figura 14).

Em seguida, os requerentes avaliaram estes mutantes de P-selectina quanto à ligação a glicolípidos imobilizados e células (Figura 15). As medições da ligação deste painel de mutantes ao glicolípido 2'3 sLex indicou que a P-selectina parece utilizar alguns dos mesmos resíduos que a E-selectina na ligação deste hidrato de carbono (Figura 15A). Enquanto que os mutantes de P-selectina com as substituições K8A e K84A ainda ligam o 2'3 sLex, os mutantes Y48F e K113A eram completamente negativos. Na E-selectina, o mutante K111A não se ligou a 2'3 sLex, os mutantes Y48F e K113A eram completamente negativos. Na E-selectina, o mutante K111A não se ligou a 2'3 sLex de todo. Aqui, no entanto, o mutante K111A de P-selectina mediou a ligação parcial a 2'3 sLex, indicando talvez uma diferença subtil no reconhecimento deste açúcar pela E- e P-selectina. Há um conjunto diferente de resíduos que parece ser importante para a ligação à forma 2'6 do sLex (Figura 15B). As substituições K8A, K111A e K113A eliminaram a ligação, enquanto que o Y48 não teve efeito. O mutante K84A ainda ligou o 2'S sLex (Figura 15B). Quando se avaliou a ligação do sulfatido, surgiu um terceiro padrão (Figura 15C). Apenas a mutação K113A decresceu significativamente a ligação do sulfatido pela P-selectina. Estes resultados indicam que a mesma face da P-selectina parece participar na ligação destes três glicolípidos, com diferenças subtis nos resíduos utilizados para ligar cada açúcar.

Uma vez que um dos testes mais relevantes para medir as interacções da P-selectina com o seu ligando é o teste de ligação a células, o painel de mutantes foi avaliado por citometria de fluxo para coloração de células HL60 (Figura 14D). É interessante notar que o padrão de ligação observado com estas células mimetiza o observado com o glicolípido 2'3 sLex imobilizado. Tanto o K8A, como o K84A, se ligam a células HL60, o Y48F e o K113A não se ligam e o K11A liga-se a células HL60, apenas parcialmente. Observaram-se reactividades semelhantes quando os neutrófilos foram corados (dados não apresentados). Assim, a mutação de resíduos neste bolso da P-selectina também afectou a ligação ao seu ligando cognato nas células. Além disso, a comparação da reactividade deste painel de mutantes com glicolípidos purificados proporcionou algumas considerações pontuais sobre a natureza do hidrato de carbono reconhecido pela P-selectina (veja-se Discussão).

Na E-selectina, a arginina na posição 97 também era importante para o reconhecimento do açúcar. A mutação deste resíduo para alanina aboliu completamente a ligação E-selectina/2'3 sLex (Exemplo 1). O resíduo na posição 97 na P-selectina é uma serina e os resultados acima indicaram que a P-selectina parece utilizar a mesma região que a

E-selectina na ligação ao seu ligando. Assim, os requerentes testaram se esta diferença nos resíduos na posição 97 poderia ser responsável pelas diferenças na ligação do ligando pela E- e P-selectina. A avaliação dos modelos tridimensionais dos domínios de lectina da E- e P-selectina revela que o aminoácido 97 está numa dobra formada pelos resíduos 94-100, que é uma inserção nas selectinas relativamente à proteína de ligação à manose. A sequência destas duas selectinas é bastante diferente nesta extensão - YIKREKDV para a E-selectina *vs.* YIKSPSAP para a P-selectina, de modo que é esperado que estas dobras tenham conformações diferentes. A fim de testar a importância do resíduo na posição 97, em conferir especificidade para as selectinas, os requerentes produziram um mutante de P-selectina-IgG em que a dobra 94-100 foi substituída pelos resíduos correspondentes da E-selectina: S97R, P98E, S99K, A100D, P101V. Os requerentes testaram então este mutante (abreviado REKDV) quanto à ligação a anticorpos, glicolípidos e células. A ligação do mutante REKDV de P-selectina-IgG a cada um dos três mAb's anti-P-selectina (AK-6, AC1,2 e CRC 81) era de aproximadamente 70% da ligação controlo de P-selectina-IgG. Isto parecia indicar que embora a conformação deste mutante esteja bastante correcta, poderão estar presentes algumas perturbações estruturais subtis. Deste modo, este mutante não se liga a nenhum dos glicolípidos purificados (dados não apresentados). No entanto, o mutante REKVD ligou-se às células HL60, embora a sua ligação fosse significativamente menor do que a observada com a P-selectina-IgG controlo (70% de células positivas, MFI 290 para o mutante REKDV *vs.* 97% de células positivas, MFI 416 para P-selectina-IgG controlo). Assim, a transferência desta dobra (que contém o resíduo 97), da E-selectina para a P-selectina não rompeu completamente a capacidade do mutante de P-selectina resultante reconhecer o seu ligando celular. Estes resultados devem ser devidos a diferenças fora desta região (veja-se Discussão).

Discussão

A investigação das interacções selectina-hidrato de carbono continua a ser dificultada, devido a uma falta de compreensão das estruturas de açúcar reconhecidas por cada molécula de adesão. No entanto, os resultados de várias aproximações, incluindo estudos de ligação directa, estudos de inibição de hidratos de carbono solúveis e análises estruturais e conformacionais de ligandos potenciais purificados indicaram semelhanças no reconhecimento de selectina. Muitas destas observações centraram-se em torno da estrutura do núcleo de sLex. No entanto, muitas destas semelhanças propostas poderão ser artefactos de uma ligação forçada, em condições experimentalmente manipuladas (veja-se Varki, A., Cur. Opin. Cell. Biol. 4: 257-266 (1952) para discussão). Os testes *in vitro* com ligandos de hidratos de carbono de fase sólida e as selectinas sobre-expressadas transfectadas podem ser enganosos devido às densidades elevadas, de forma não natural, de ambos os receptores e

ligandos (Varki, A. supra). Além disso, açúcares não relacionados podem inibir a mesma interacção de lectina, devido a mimetização estrutural (Varki, A. supra). O teste de citometria de fluxo aqui utilizado para medir as interacções da P-selectina com o seu ligando celular deverão evitar a maioria destas limitações, sendo ao mesmo tempo sensíveis e convenientes. As experiências aqui apresentadas indicam que a ligação medida, observada utilizando a quimera de P-selectina-IgG para corar as células de forma precisa, representa esta interacção. Os estudos realizados até agora mostraram que a P-selectina se liga a uma, e possivelmente única, glicoproteína principal de 120 Kd (Cummings, R.D. *et al.*, J. Cell Biol. 118: 445-456 (1992). A mesma glicoproteína foi isolada de ambos os neutrófilos e células HL60 (Cummings, R.D. *et al.* supra) e o número destes locais de ligação para a P-selectina é estimado em 10.000-20.000 por célula (McEver, R.P. *et al.*, J. Cell Biol. 112: 491-499 (1991), Cummings, R.D. *et al.*, supra, Berndt, M.C., J. Biol. Chem. 266: 5371-5374 (1991)). O sLex forma provavelmente algum componente desta glicoproteína ligando e o sLex é suficiente para conferir alguma ligação à P-selectina. No entanto, o sLex não é suficiente para conferir características de ligação de alta afinidade, saturáveis da adesão de P-selectina (McEver, R.P. *et al.* supra). Assim, o ligando de P-selectina deve ter características estruturais além do sLex, que conferem especificidade e afinidade (Cummings, R.D. *et al.*, supra; R.D. Cummings, J. Cell Biol 115: 557-564 (1991)).

A porção de proteína do ligando de P-selectina pode contribuir para esta especificidade e afinidade por (a) apresentar o açúcar na conformação correcta, (b) apresentar açúcares multivalentes para aumentar a avidez de ligação; e (c) participar num contacto proteína/proteína com a P-selectina (Cummings, R.D. *et al.*, supra). De facto, já foi proposto um papel para a apresentação de ligandos polivalentes a L-selectina pelo ligando GlyCAM 1 (Dowbenko, D. *et al.*, Cell 69:927-938 (1992)). No teste aqui descrito, a ligação de P-selectina-IgG foi eliminada por tratamento das células com protease, o que é consistente com a necessidade desta glicoproteína (Ahern,T.J. *et al.* J. Biol. Chem. 267: 11104-11110 (1992). Como referido acima, o ácido siálico é crucial para a ligação de P-selectina e o tratamento com sialidase também eliminou a ligação. De maior importância, a remoção da quelatação do cálcio pelo EGTA também conduziu a uma perda de ligação, um resultado que é uma assinatura das interacções biologicamente relevantes, realizadas por todas as lectinas do tipo-C (Drickamer, K. *et al.*, supra). Uma descoberta surpreendente foi a de que a quimera E-selectina-IgG não se liga a células HL60 ou neutrófilos neste teste de coloração de fase fluida. Isto apesar do facto de o ligando de hidrato de carbono da E-selectina, o sLex ser claramente expresso por estas células (Gaeta, F.C.A. Science 250: 1130-1132 (1990); Aruffo, A., Science 250: 1132-1135 (1990)). Além disso, os requerentes e outros autores (Alford, J. *et al.*, J. Leuk. Biol. 52: 85-88 (1992)) verificaram que a E-selectina-IgG é capaz de se ligar a células HL60 e a neutrófilos, quando a quimera se

apresenta num substrato sólido, sugerindo que a ausência de ligação em fase fluida pode ser devida a uma menor afinidade da E-selectina para o seu ligando de superfície celular. Assim, a E-selectina e a P-selectina são claramente distintas na ligação a células, tanto como quimeras de Ig solúveis, como quando são expressas em superfícies celulares endoteliais/de plaquetas.

Pelo menos parte desta diferença entre a E- e a P-selectina deve ser devida a diferenças nos seus domínios de lectina. A transferência do domínio da P-selectina para a construção de E-selectina-IgG resultou numa molécula (PE-1) que corou as células, apesar de com uma menor intensidade do que a P-selectina-IgG. A reactividade dos hidratos de carbono foi completamente transferida com o domínio de lectina relevante. Assim, a PE-1 reagiu com os glicolípidos purificados de um modo indistinguível da P-selectina-IgG e bastante diferente da E-selectina-IgG. Assim, o domínio de lectina de cada selectina parece ser suficiente para determinar as diferenças nas reactividades com estes açúcares relativamente pequenos. Este resultado é consistente com um estudo de Kansas *et al.* (Kansas G.S. *et al.* J. Cell Biol. 114: 351-358 (1991)), em que os domínios da L- e P-selectina foram trocados, para mostrar que a ligação de PPME e fucoidina, ambos hidratos de carbono, ligandos específicos da L-selectina, bem como o epítopo definido pelo mAb bloqueador LAM-13, estão localizados, pelo menos em parte nos 67 resíduos de aminoácidos do terminal-C do domínio de lectina de L-selectina. Estes autores demonstraram também que os domínios de CR não são importantes para conferir especificidade à PPME ou fucoidina (Kansas, G.S. *et al.*, supra). Os domínios de EGF e CR das selectinas mostraram claramente realizar papéis estruturais vitais para estes receptores (Bowen, B. *et al.* J. Cell Biol. 107: 1853-1862 (1990); Jutila, M.A *et al.* J. Exp. Med. 175: 1565-1573 (1992); Aruffo, A. *et al.* Science 250: 1132-1135 (1990); Fennie, C. *et al.*, J. Cell Biol. 115: 235-243 (1991)). O facto de estes domínios na P-selectina também participarem em contactos cruciais com este ligando de glicoproteína não pode ser respondido aqui. No entanto, os resultados deste estudo colocam limitações à natureza de quaisquer destes contactos. Em primeiro lugar, a quimera de P-selectina-IgG aqui utilizada apenas contém os domínios de lectina, EGF e CR1 da P-selectina (Dowbenko, S. *et al.* supra). Assim, CR2-CR9 não têm que constituir contactos necessários para a ligação de alta afinidade entre a P-selectina e o seu ligando e é interessante notar que a P-selectina de rato não possui o domínio CR2 (Isenmann, S. *et al.* J. Biol. Chem. 267: 15176-15183 (1992). Além disso, uma vez que a quimera PE-1 não se liga a células, qualquer local de contacto potencial proteína/proteína pode ser mapeado no domínio de lectina da P-selectina. A diferença na coloração entre a PE-1 e a P-selectina-IgG pode reflectir efeitos conformacionais subtis dos domínios de EGF da P- e E-selectina que interagem com o domínio de lectina comum. No

entanto, é importante sublinhar que não se podem excluir os contactos proteína/proteína mediados pelos domínios EGF ou CR1.

Dois estudos recentes identificaram regiões do domínio de lectina da P-selectina que podem ser importantes para a adesão celular. Geng e colaboradores mostraram que um mAb capaz de inibir a ligação de neutrófilos a P-selectina foi mapeado nos resíduos 19-34 desta molécula e que um péptido correspondente a esta extensão também inibiu a ligação de neutrófilos à P-selectina (Geng, J.G. *et al.*, J. Biol. Chem. 266: 22313-22318 (1991)). Este grupo descreve outros péptidos do domínio de lectina da P-selectina (correspondentes aos resíduos 23-30, 54-63 e 70-79), que bloquearam a adesão mediada por P-selectina (Gang, J.G. *et al.*, J. Biol. Chem. "Lectin-domain peptides from selectines interact with both cell surface ligands and Ca^{2+} ligands", em impressão (1991). No modelo da P-selectina, estes resíduos estão no lado oposto do domínio de lectina, ao local que os requerentes identificaram como importante para a ligação selectina-hidrato de carbono e adesão celular (veja-se Exemplo 1). Os resíduos caracterizados por Gong e colaboradores podem representar um segundo local na P-selectina que poderá ligar o componente de hidrato de carbono e/ou proteína do seu ligando. Nesta base, é importante lembrar que os resultados com o mutante REKDV indicam que nem todas as diferenças na especificidade entre a E- e P-selectina podem ser explicadas pela região identificada neste estudo. Assim, a co-operação possível deste local com os descritos por Geng *et al.* em conferir especificidade à ligação de P-selectina, necessita ser explorada.

Os resultados aqui apresentados estabelecem que o local anteriormente identificado como crucial para a ligação de E-selectina a 2'3 sLex, é também crucial para a ligação da P-selectina a este ligando. As mutações em dois dos resíduos conservados neste local, Y48 e K113, aboliram completamente a ligação de 2'3 sLex e a adesão celular por ambas a E- e P-selectina. O Mab bloqueador anti-selectina, AK-6 foi mapeado neste mesmo local, tal como o foram todos os mAb's bloqueadores anti-E-selectina. Além disso, o Mel-14, um mAb que bloqueia a adesão in vitro e in vivo mediada por L-selectina, foi mapeado nesta região (Bowan, B. *et al.*, supra). O facto de os mAbs bloqueadores da adesão de todas as três selectinas se ligarem a resíduos no mesmo local, enfatiza a sua importância para as funções de adesão destas proteínas.

Comparando a ligação do painel de mutantes de P-selectina a 2'3 sLex, 2'6 sLex e sulfatidos, com a sua capacidade de se ligar a células, pode-se conseguir algum esclarecimento quanto à natureza do componente de hidrato de carbono do ligando de P-selectina. Como referido acima, um estudo mostrou que a E- e a P-selectina têm especificidades para hidratos de carbono relacionadas, mas distintas (Ahern, T.J., supra). Por

exemplo, estes autores verificaram que a interacção da E-selectina com o componente sLex do ligando de P-selectina impede a ligação da P-selectina (Ahern, T.J., supra). Utilizando uma lectina específica de 2'6-sialilo para bloquear a ligação da P-selectina, estes autores propuseram também que o ligando de P-selectina pode conter uma estrutura de hidrato de carbono bi-dentado, com um braço que contém o 2'3 sLex e o outro um sialil-2'6 beta Gal terminal (Dell, a. *et al.*, J. Biol. Chem. 259: 10925-10935 (1984); Ahern, T.J. supra). No entanto, os resultados dos requerentes com os mutantes de P-selectina parecem por em questão o papel do ácido siálico ligado em 2'6 na adesão celular. O mutante K8A não se ligou à forma 2'6 de sLex, mas continuou a ligar-se ao ligando de P-selectina nas células. Além disso, o mutante Y48F não se ligou a células, mas ainda se ligou a 2'6 sLex. Consequentemente, a ligação de 2'6 sLex não se correlacionou com a ligação do ligando. No entanto, a ligação a 2'6 sLex nos testes de fase sólida aqui utilizados é fraca, em comparação com a ligação de 2'3 sLex e sulfatido, de modo que se deve ter algum cuidado na interpretação destes resultados. Assim, é concebível que a apresentação do hidrato de carbono sialilado em 2'6 à P-selectina proporcione um parâmetro crítico do reconhecimento do ligando que não é reproduzido no teste em fase sólida (Dowbenko, D. *et al.*, supra).

Uma segunda actividade de ligação da P-selectina, cuja relevância biológica foi recentemente posta em causa, é a interacção com sulfatidos. A ligação de sulfatidos pela P-selectina não é provavelmente relevante *in vivo*, devido à observação de que esta interacção não é dependente de cálcio, não é removida por proteases e que as células que expressam sulfatidos (eritrócitos e plaquetas) não se ligam necessariamente à P-selectina (R.D. Cummings, *et al.* J. Cell Biol. 118: 445-456 (1992)). Além disso, a ligação de sulfatidos pelos mutantes de P-selectina aqui estudados não se correlaciona com a ligação celular. Por exemplo, o mutante Y48F liga-se a sulfatidos, mas não aderiu a células. A ligação a células estava apenas correlacionada com a ligação de 2'3 sLex. Cada mutante que se liga a 2'3 sLex, liga-se a células (K8A e K84A), enquanto que aqueles que não ligaram 2'3 sLex (Y48F e K113A) não se ligaram a células e um mutante (K111A) apresentou uma ligação parcial tanto a 2'3 sLex, como às células. Isto é interessante, tendo em conta um estudo recente que demonstra que a expressão de 2'3 sLex está correlacionada com a capacidade da célula se ligar a plaquetas activadas, através da P-selectina (De bruijne-Admiraal *et al.*, supra) e é consistente com os estudos bloqueadores de mAb e hidratos de carbono de Polley *et al.* (Hakomori, S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 6224-6228 (1991)).

Embora não se possa excluir o envolvimento do ácido siálico ligado em 2'6, ou dos sulfatidos nas interacções da P-selectina com o seu ligando, os dados aqui apresentados questionam claramente o papel (se existente) que estes possam desempenhar. A

especificidade da ligação entre a E e a P-selectina pode derivar do modo em que o 2'3 sLex se apresenta (*i.e.* glicolípido *vs* glicoproteína). No entanto, deve conceder-se que o 2'3 sLex não seja o hidrato de carbono ligando que ocorre naturalmente, reconhecido por qualquer das selectinas, e que estas diferenças na ligação das selectinas poderão ser justificadas pelas alterações subtis no próprio sacárido (Varki, A. supra). Os sulfatidos, bem como os glicanos sulfatados, heparina, fucoidina e sulfato de dextrano, podem inibir a função da P-selectina, ao mimetizar o seu ligando (R.D. Cummings, *et al.*, J. Cell Biol 118: 445-456(1992)). O sLex, glicanos sulfatados e sulfatidos têm todos uma carga negativa que pode desempenhar um papel na interacção da P-selectina com o seu ligando (De bruijne-Admiraal *et al.*, supra; Exemplo 1) e estes açúcares poderão inibir a adesão mediada por selectina, ao ligarem-se a um local comum (por exemplo no K113), que é importante para as interacções P-selectina/ligando.

Exemplo 4

As sequências de ADN que codificam para toda a porção extracelular da E-selectina humana (aminoácidos 1M a 532S) foram fundidos com os 37 aminoácidos do terminal carboxi de CD16, que contém a sequência sinal para a ancoragem da superfície celular, através de uma ligação glicosilfosfatidilinositol (GPI). A construção de fusão foi clonada no vector plasmídeo pEF-Bos (Mizushima e Nagata, Nucl. Acids Res. 18, 5322 (1990) e a E-selectina ancorada na GPI, expressa sob o controlo do promotor cromossómico EF-Ialfa. Introduziram-se mutações pontuais nesta construção de ADNc, utilizando técnicas de mutagénese direccionada por oliginucleótidos, convencional, como descrito no Exemplo 1. A expressão transiente em células COS-7 foi utilizada para determinar o impacto de cada mutação de E-selectina na estrutura/função.

A função das E-selectinas mutantes foi determinada realizando testes de adesão com neutrófilos humanos, como descrito no Exemplo 3. Verificou-se que as seguintes mutações eliminam a ligação de neutrófilos, sem alterar o seu reconhecimento pelo painel de Mabs: Y48F, Y94F, R97A, K111a e K113A E-selectina. Uma mutação na posição 105 (N105D) mostrou uma redução acentuada na ligação de anticorpos monoclonais específicos para o domínio egf de lectina, sugerindo uma perturbação estrutural grave. Além disso, a E8A e R84, K86A exibiram uma capacidade de ligação de neutrófilos aumentada. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos no teste de ligação de sLex descrito no Exemplo 1.

Embora o anterior se refira a formas de concretização preferidas, deve entender-se que o presente invento não está por estes limitado. Será evidente para os peritos na arte que

se podem efectuar várias modificações às formas de concretização descritas, sem se afastar do conceito geral do invento. Todas estas modificações estão no âmbito do presente invento.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL

(i) REQUERENTE: Genentech, Inc., F. Hoffmann-La Roche AG

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Variantes de selectina

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS : 35

(iv) MORADA PARA CORRESPONDÊNCIA:
- (A) DESTINATÁRIO: Genentech, Inc
- (B) RUA: 460 Point san Bruno Blvd
- (C) CIDADE: São Francisco do Sul
- (D) ESTADO: Califórnia
- (E) PAÍS: USA
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 94080

(v) FORMA DE LEITURA DO COMPUTADOR:
- (A) TIPO DE MEIO: disquete de 5,25", 360 kb
- (B) COMPUTADOR: PC compatível com IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: patin (Genentech)

(vi) DADOS DO PEDIDO ACTUAL:
- (A) NÚMERO DO PEDIDO:
- (B) DATA DE DEPÓSITO:
- (C) CLASSIFICAÇÃO:

(vii) DADOS DO PEDIDO ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DO PEDIDO: 07/879036
- (B) DATA DE DEPÓSITO: 30-ABR-1992

(viii) INFORMAÇÃO PARA MANDATÁRIO/AGENTE:
- (A) NOME: Dreger, Ginger R.

(B) NÚMERO DE REGISTO: 33,055
(C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/ENTRADA: 761P1

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:
(A) TELEFONE: 415/266-3216
(B) TELEFAX: 415/952-9881
(C) TELEX: 910/371-7168

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 1

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº1:

ATAAGTCATA GCGGCCGTGG AGGTGTT 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 2

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº2:

CTCATTATAA GTGGCAGCTT CCGTGGA 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 3

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº3:

ACTGGCCTCA TTGGCAGTCA TAGCTTC 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 4

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº4:

ATAAGCACTG GCTGCATTAT AAGTCAT 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 5

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº5:

CTCAATCTCT TCTGCGTTTT GAATTGC 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 6

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº6:

ACTTGGTGAA TAGGCCAATA TGGAGTT 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 7

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº7:

ATAACTTGGT GAAGCGCTCA ATATGGA 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 8

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº8:

GTAATAACTT GGTGCATAGC TCAATAT 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 9

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº9:

CCAGTAATAA CTTGCTGAAT AGCTCAA 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 10

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº10:

AATCCAGTAA TAAGCTGGTG AATAGCT 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 11

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº11:

TCCAATCCAG TAAGCACTTG GTGAATA 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 12

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº12:

GATTCCAATC CAGGCATAAC TTGGTGA 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 13

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 33 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº13:

TTCTTCTGTC AGAGGCGCCT GGGTTCCTAC CCA 33

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 14

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 36 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº14:

GGGTTCACCT GGCGCCCAGT TCGCGGCTTC TTCTGT 36

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 15

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 39 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº15:

CACGCAGTCC TCATCTGCTT GCGCATTGTT GGGTTCACC 39

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 16

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº16:

CTTGATGTAG ATGGCCACGC AGTCCTC 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 17

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº17:

TCTCTTGATG TAGGCCTCCA CGCAGTC 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 18

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº18:

TTCTCTCTTG ATGGCGATCT CCACGCA 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 19

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº19:

TTTTTCTCTC TTGGCGTAGA TCTCCAC 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 20

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº20:

ACTTTTTCT CTCGCGATGT AGATCTC 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 21

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº21:

CACATCTTTT TCAGCCTTGA TGTAGAT 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 22

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº22:

GCCCACATCT TTGGCTCTCT TGATGTA 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 23

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº23:

CATGCCCACA TCGGCTTCTC TCTTGAT 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 24

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº24:

CCACATGCCC ACGGCTTTTT CTCTCTT 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 25

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº25:

ATTCCACATG CCAGCATCTT TTTCTCT 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 26

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº26:

CTCATCATTC CATGCGCCCA CATCTTT 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 27

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº27:

CTTGCTGCAC CTCGCATCAT TCCACAT 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. NO: 28

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº28:

GGCAAGCTTC TTGGCGCTGC ACCTCTC 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 29

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº29:

GCATAGGGCA AGAGCCTTCT TGCTGCA 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 30

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 36 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº30:

AGCTTCCGTG GAGTAGTGGT AAGTCCAGGC TCCACT 36

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 31

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 33 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº31:

ATTATAAGTC ATATTTTCCG CGGAGGTGTT GTA 33

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 32

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 33 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº32:

ACTGGCCTCA TTCCAACTGT AAGCTTCCGT GGA 33

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 33

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 36 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº33:

ATTCCACATG CCCGTATCTT TTGGTCTCTT GATGTA 36.

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 34

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº34:

CCAGTTCATG GGGGCTTCAG AATAATG 27

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID. Nº: 35

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA
(A) COMPRIMENTO: 27 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ. ID. Nº35:

CCATGAGTAT GCAGCTGTGC TGTAATG 27

Lisboa, 27. SET. 2000

Por GENENTECH, INC.
- O AGENTE OFICIAL -

O ADJUNTO

ENG.º ANTÓNIO JOÃO DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1. Variante de E-, L- ou P-selectina humana, diferente de uma selectina nativa, com uma substituição de aminoácidos numa ou mais das posições de aminoácidos 7-9, 43-48, 94-100, 111 e 113 da selectina humana nativa correspondente.

2. Variante de acordo com a reivindicação 1, em que a substituição ocorre numa ou mais das posições de aminoácido 7-9, 47, 48, 94, 97, 99, 111 e 113, da selectina humana nativa correspondente.

3. Variante de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a substituição ocorre nos resíduos de aminoácido números 7-9, da selectina humana nativa correspondente.

4. Variante de acordo com a reivindicação 3, que é uma variante de E- ou L-selectina e tem um aminoácido não carregado substituído por um resíduo de aminoácido carregado número 8, do domínio de lectina da selectina humana nativa correspondente.

5. Variante de acordo com a reivindicação 4, em que o aminoácido substituído é alanina, valina, serina ou treonina.

6. Variante de acordo com a reivindicação 5, em que o aminoácido substituído é alanina.

7. Variante de acordo com a reivindicação 6, que é uma variante de E-selectina e tem alanina substituída por ácido glutâmico na posição de aminoácido 8, do domínio de lectina da E-selectina humana nativa.

8. Variante de acordo com a reivindicação 6, que é uma variante da L-selectina e tem uma alanina substituída por lisina na posição de aminoácido 8, do domínio de lectina da L-selectina humana nativa.

9. Variante de acordo com a reivindicação 4, que tem um aminoácido carregado positivamente em pelo menos uma das posições de aminoácidos 111 e 113, do domínio de lectina da selectina humana nativa correspondente.

10. Variante de acordo com a reivindicação 9, que tem um aminoácido carregado positivamente em ambas as posições de aminoácido 111 e 113.

11. Variante de acordo com a reivindicação 10, em que o referido aminoácido carregado positivamente é lisina ou arginina.

12. Variante de acordo com a reivindicação 11, que mantém os aminoácidos nativos nas posições 111 e 113, do domínio de lectina da selectina humana nativa correspondente.

13. Variante de acordo com a reivindicação 12, que é uma variante de E- ou L-selectina e tem um aminoácido carregado positivamente em cada posição de aminoácido 97, 111 e 113, do domínio de lectina da selectina humana nativa correspondente.

14. Variante de acordo com a reivindicação 13, que mantém os aminoácidos nativos nas posições 97, 111 e 113 da selectina humana nativa correspondente.

15. Variante de acordo com a reivindicação 3, que mantém o domínio do tipo factor de crescimento epidérmico (egf) e os domínio de ligação ao complemento, da selectina humana nativa correspondente.

16. Variante de acordo com a reivindicação 15, que é E8A E-selectina ou K8A L-selectina.

17. Sequência de ácidos nucleicos que codifica para uma variante de selectina de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores.

18. Vector de expressão replicável, que contém e é capaz de expressar, numa célula hospedeira transformada, a sequência de ácidos nucleicos de acordo com a reivindicação 17.

19. Célula hospedeira transformada com o vector de acordo com a reivindicação 17.

20. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 19, que é eucariótica.

21. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 20, que é de mamífero.

22. Processo que compreende:

(a) introdução de uma substituição de aminoácidos no retalho tridimensional definido pelos resíduos de aminoácido números 7-9, 90-109 e 113, do domínio de lectina de uma L-, E- ou P-selectina humana nativa; e

(b) pesquisa da variante de selectina resultante quanto a uma maior afinidade para um ligando nativo da selectina nativa correspondente.

23. Composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapêutica ou profilacticamente eficaz da variante de selectina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, em mistura com um transportador farmaceuticamente aceitável.

24. Variante de selectina de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 16, para utilização num método de tratamento médico.

25. Utilização de uma variante de selectina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, para a preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de um sintoma ou condição associados com uma resposta inflamatória patológica, mediada por uma selectina.

26. Proteína quimérica que compreende uma fusão de uma sequência de aminoácidos que compreende uma sequência do domínio de lectina de uma L-, E- ou P-selectina, com uma substituição de aminoácidos num ou mais locais num retalho tridimensional, definido pelos resíduos de aminoácidos números 7-9, 90-109 e 113, do domínio de lectina da selectina nativa correspondente, diferente da sequência do domínio de lectina da selectina nativa, com uma sequência de um domínio constante de imunoglobulina.

27. Proteína quimérica de acordo com a reivindicação 26, que compreende um domínio do tipo egf de selectina e domínios de ligação ao complemento.

28. Composição farmacêutica que compreende uma proteína quimérica de acordo com a reivindicação 26, ou reivindicação 27, em mistura com um transportador farmaceuticamente aceitável.

Lisboa, 27 SET. 2000

Por GENENTECH, INC.
- O AGENTE OFICIAL -
O ADJUNTO

ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA

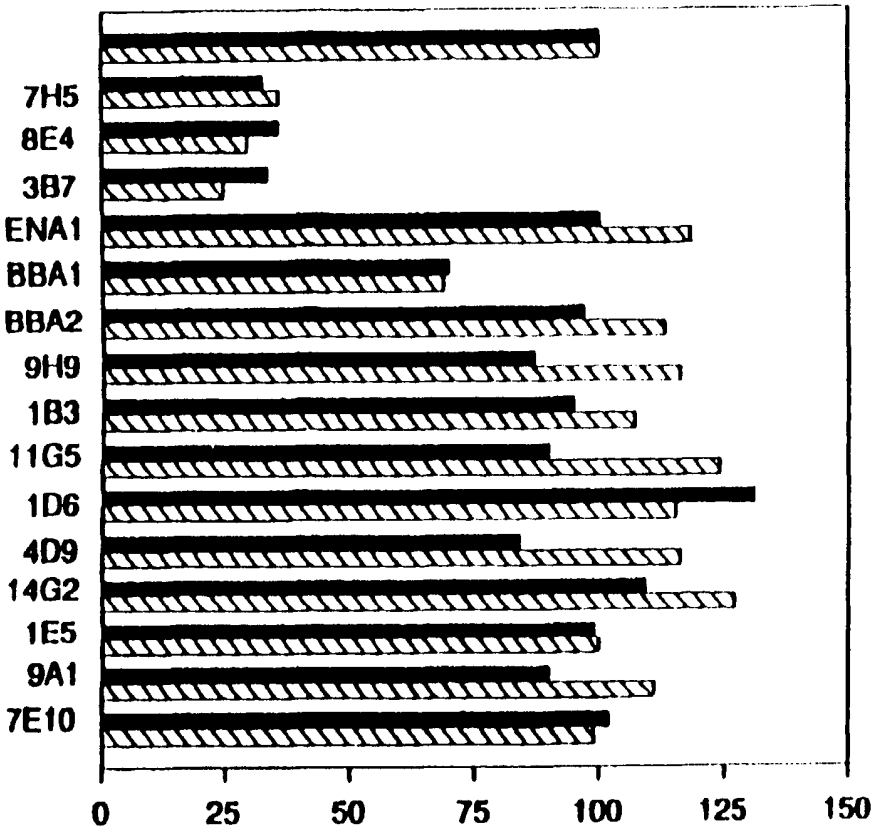

7H5
8E4
3B7
ENA1
BBA1
BBA2
9H9
1B3
11G5
1D6
4D9
14G2
1E5
9A1
7E10
0
25
50
75
100
125
150
LIGAÇÃO DE HL60 (% controlo)

FIG. 1A

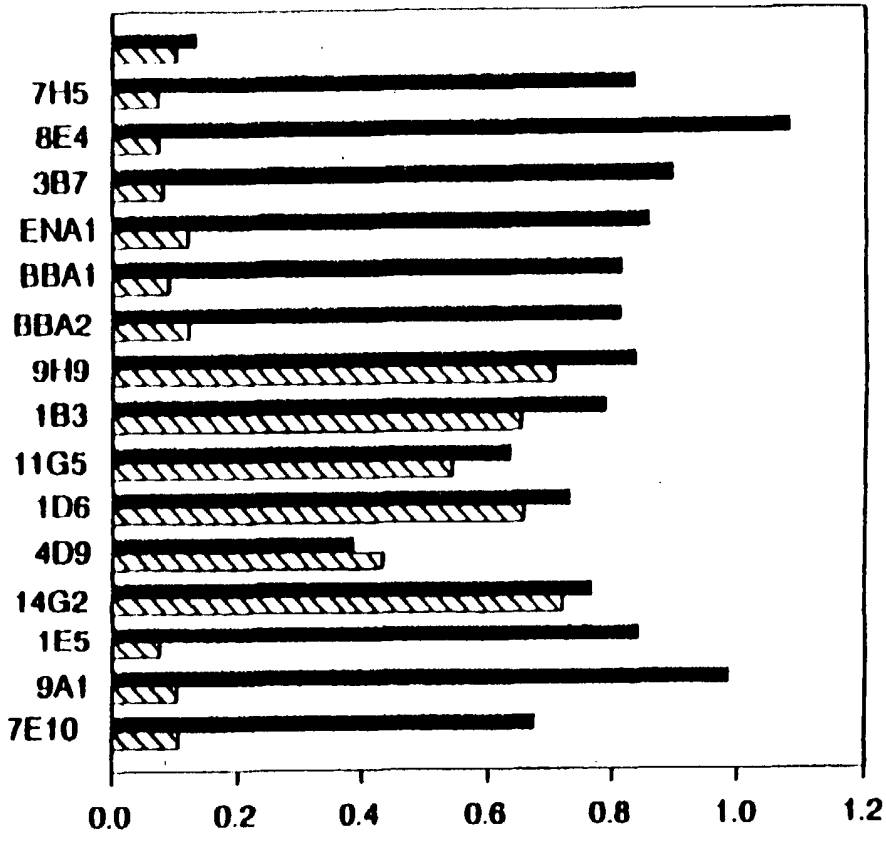

7H5
8E4
3B7
ENA1
BBA1
BBA2
9H9
1B3
11G5
1D6
4D9
14G2
1E5
9A1
7E10
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
ABSORVÂNCIA (490 nm)

FIG. 1B

	DOMÍNIOS DE LECTINA DE E-SELECTINA	Nº ID. SEQ.
	1 40	
Humano	WSYNTSTEAMTYDEASAYCQQRYTHLVAIQNKEEIEYLNS	36
Coelho	T IIF A N N D	37
	80	
Humano	ILSYSPSYYWIGIRKVNNVWVWVGTQKPLTEEAKNWAPGE	38
Coelho	D I H G	39
	120	
Humano	PNNRQKDEDCVEIYIKREKDVGMWNDERCSKKKLALCYTA	40
Coelho	K NN P T	41

FIG. 2A

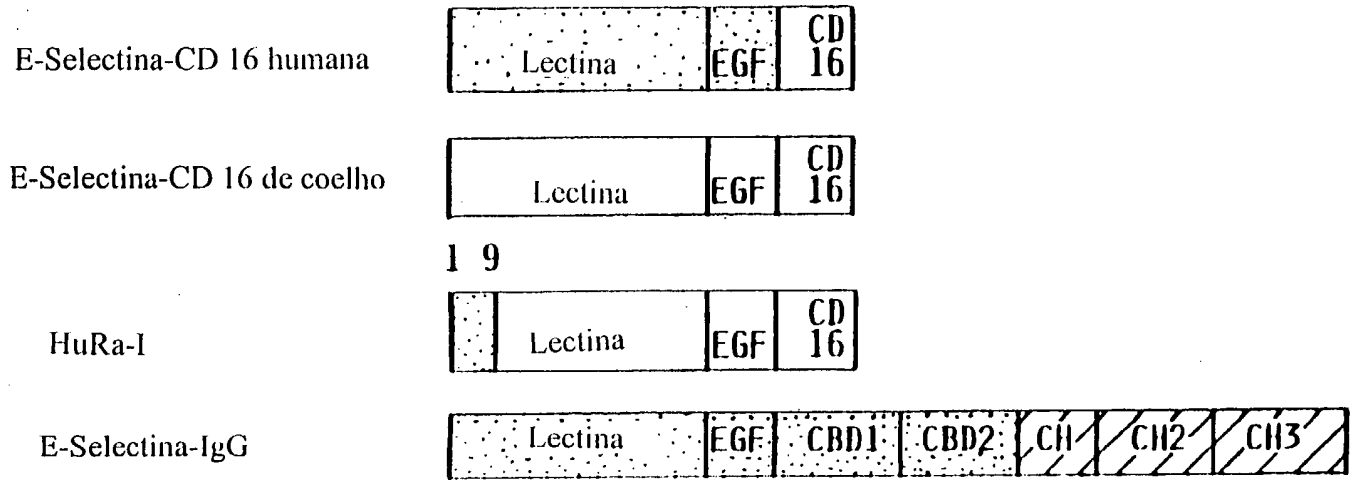


FIG. 2B

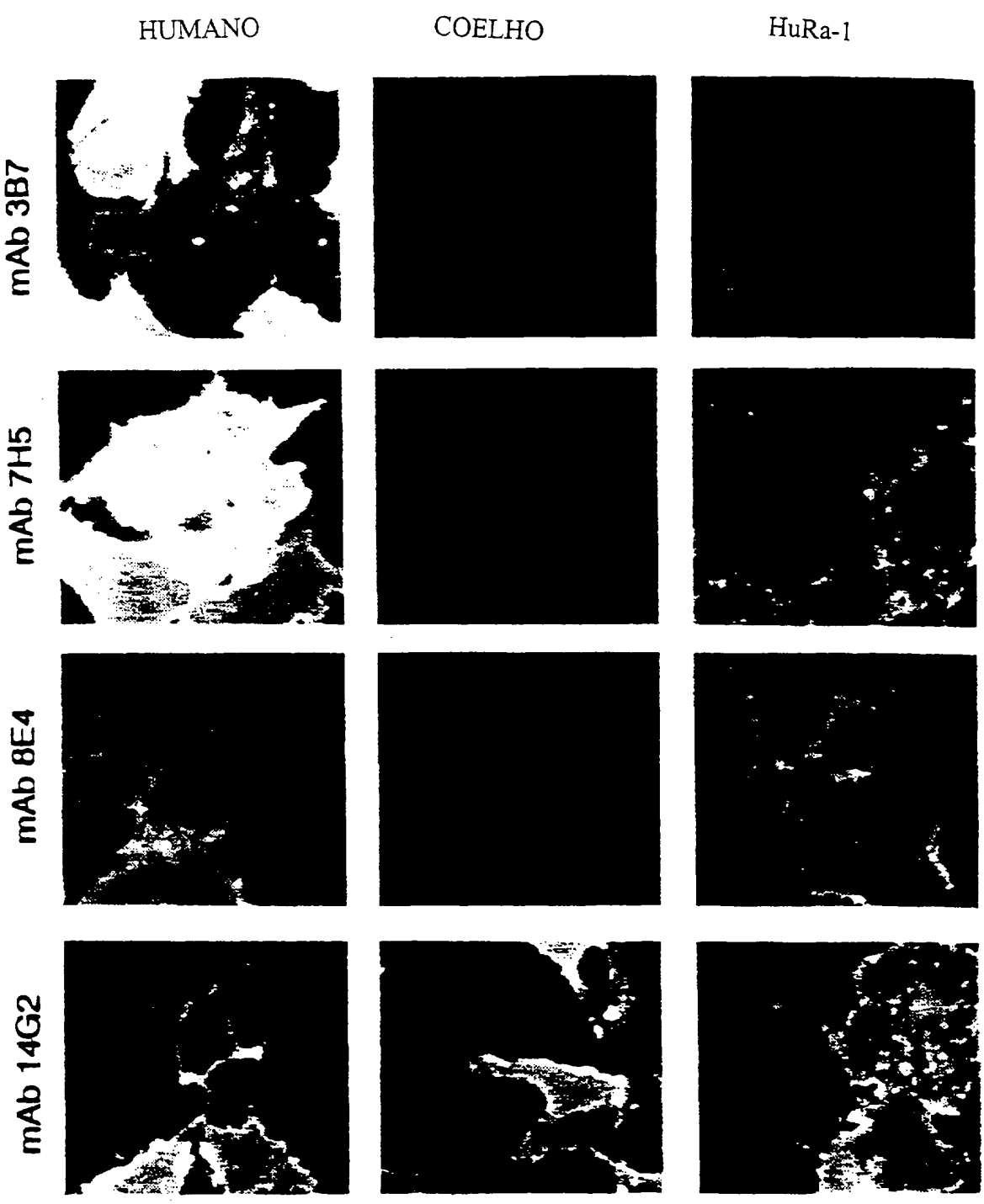


FIG. 3

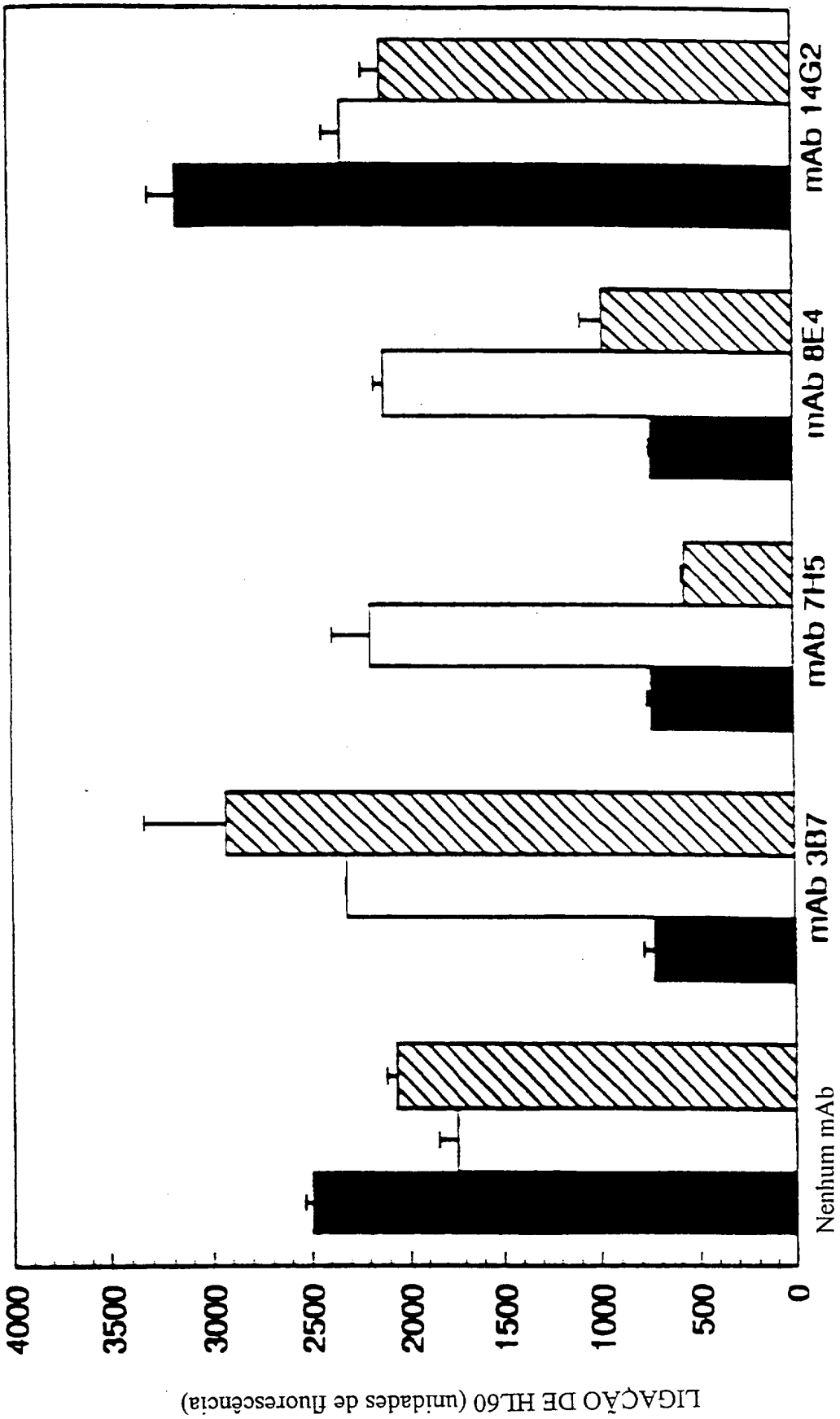

LIGAÇÃO DE HL60 (unidades de fluorescência)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Nenhum mAb
mAb 3B7
mAb 7H5
mAb 8E4
mAb 14G2

FIG. 4

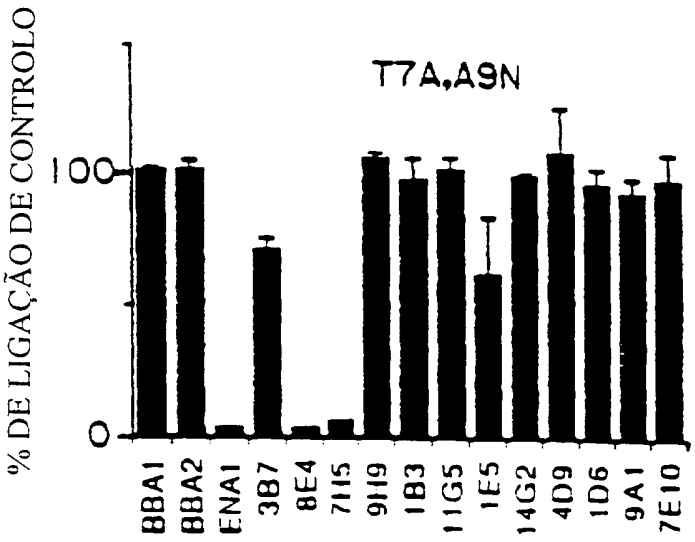


FIG. 5A

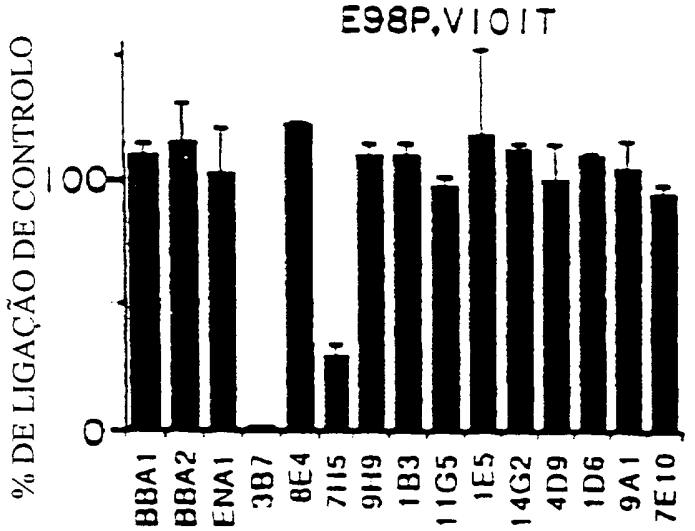


FIG. 5B

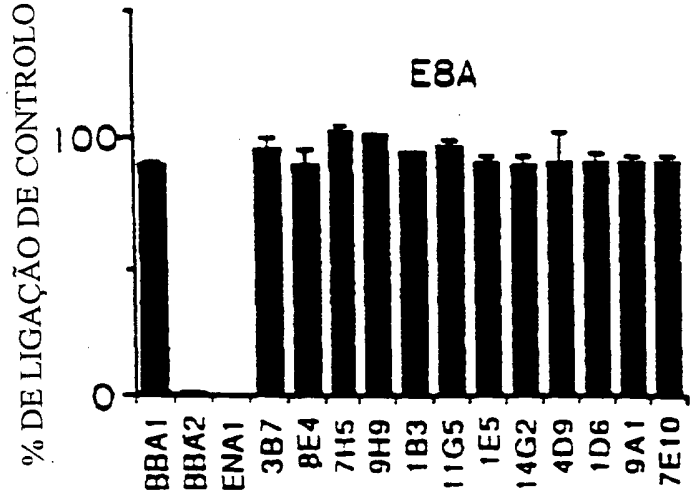


FIG. 5C

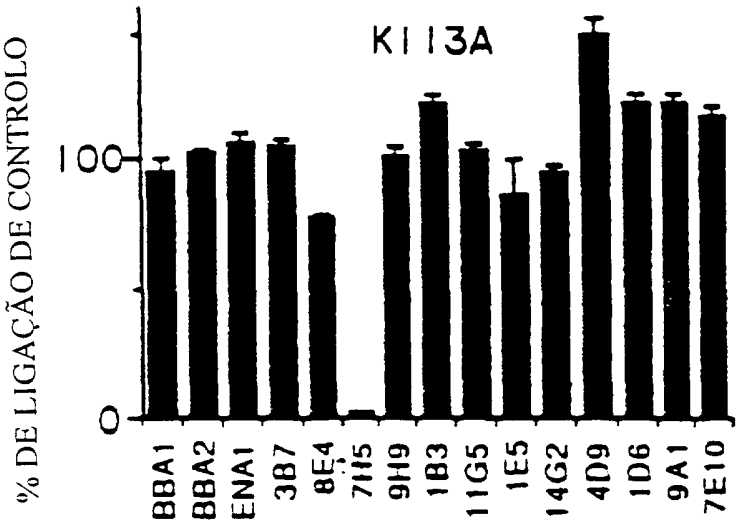

K113A
% DE LIGAÇÃO DE CONTROLO
100
0
BBA1
BBA2
ENA1
3B7
8E4
7H5
9H9
1B3
11G5
1E5
14G2
4D9
1D6
9A1
7E10

FIG. 5D

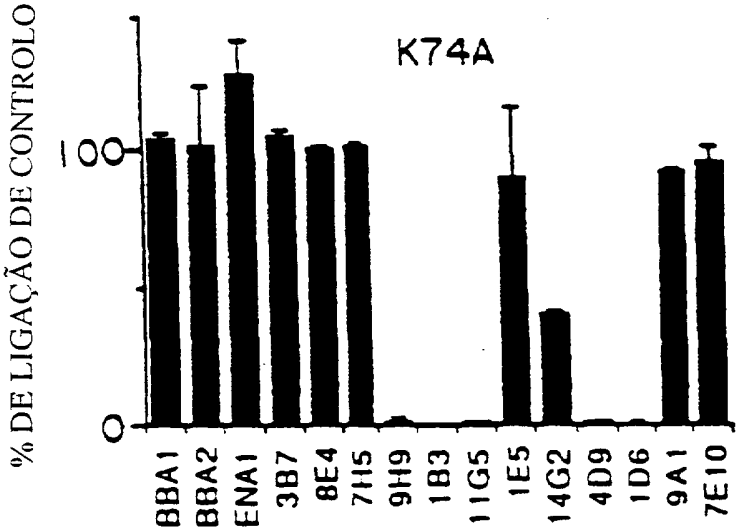

K74A
% DE LIGAÇÃO DE CONTROLO
100
0
BBA1
BBA2
ENA1
3B7
8E4
7H5
9H9
1B3
11G5
1E5
14G2
4D9
1D6
9A1
7E10

FIG. 5E

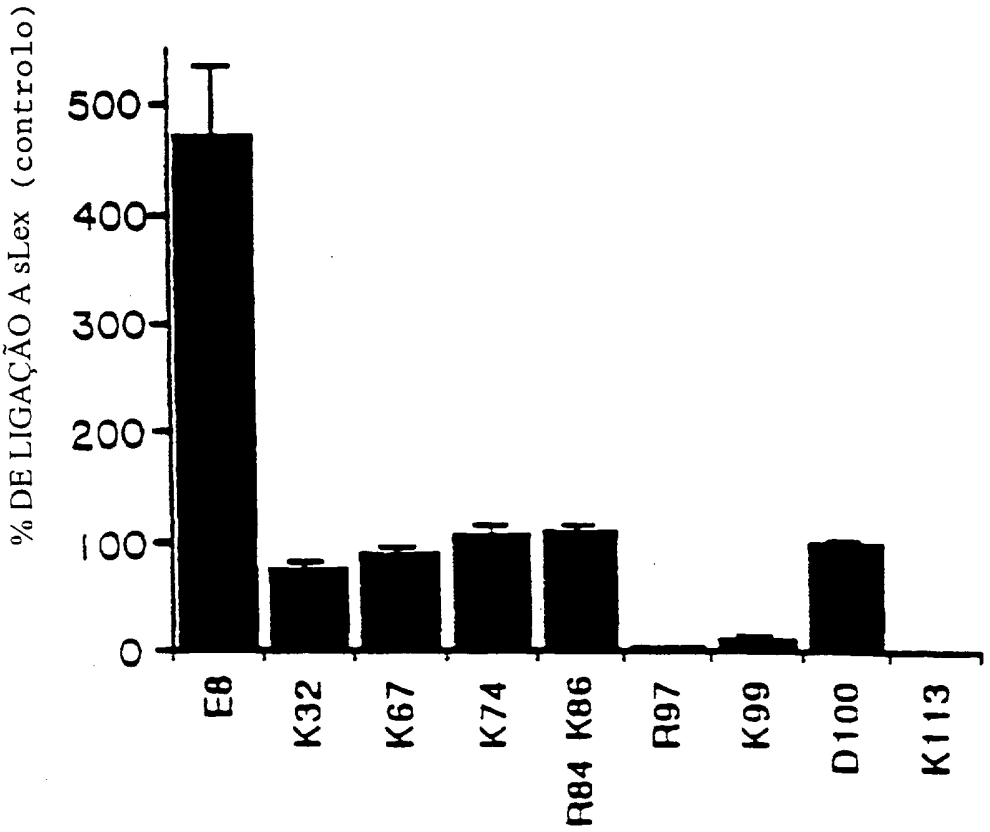

% DE LIGAÇÃO A sLex (controlo)
500
400
300
200
100
0
E8
K32
K67
K74
R84 K86
R97
K99
D100
K113

FIG. 6A

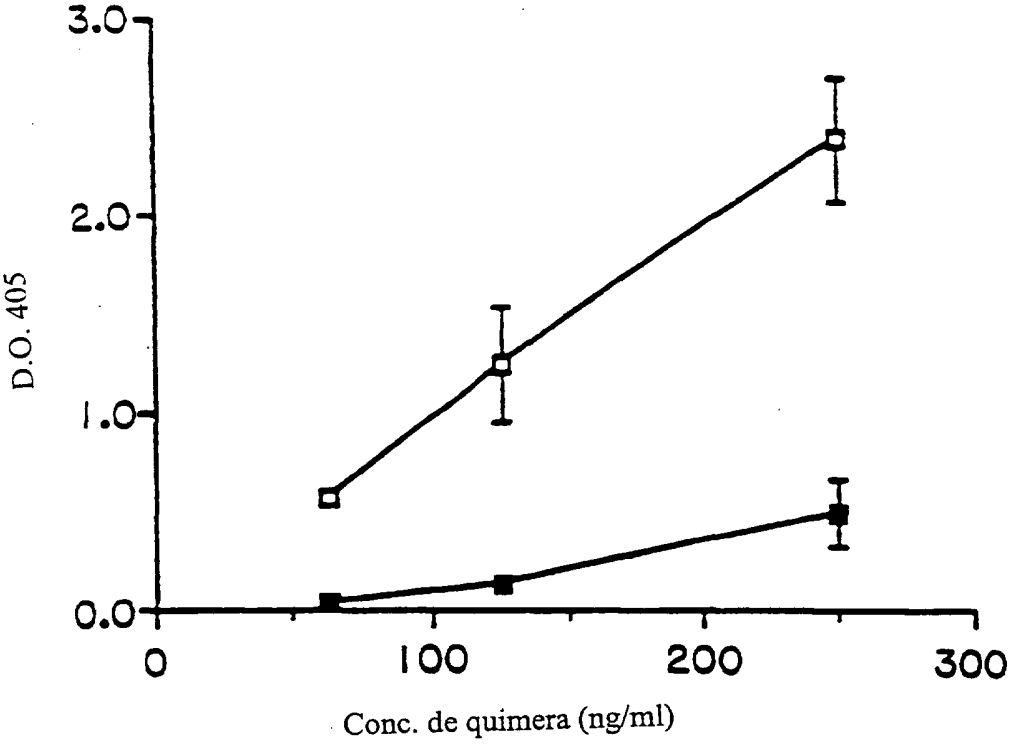

D.O. 405
3.0
2.0
1.0
0.0
0
100
200
300
Conc. de quimera (ng/ml)

FIG. 6B

FIG.7A



FIG.7B



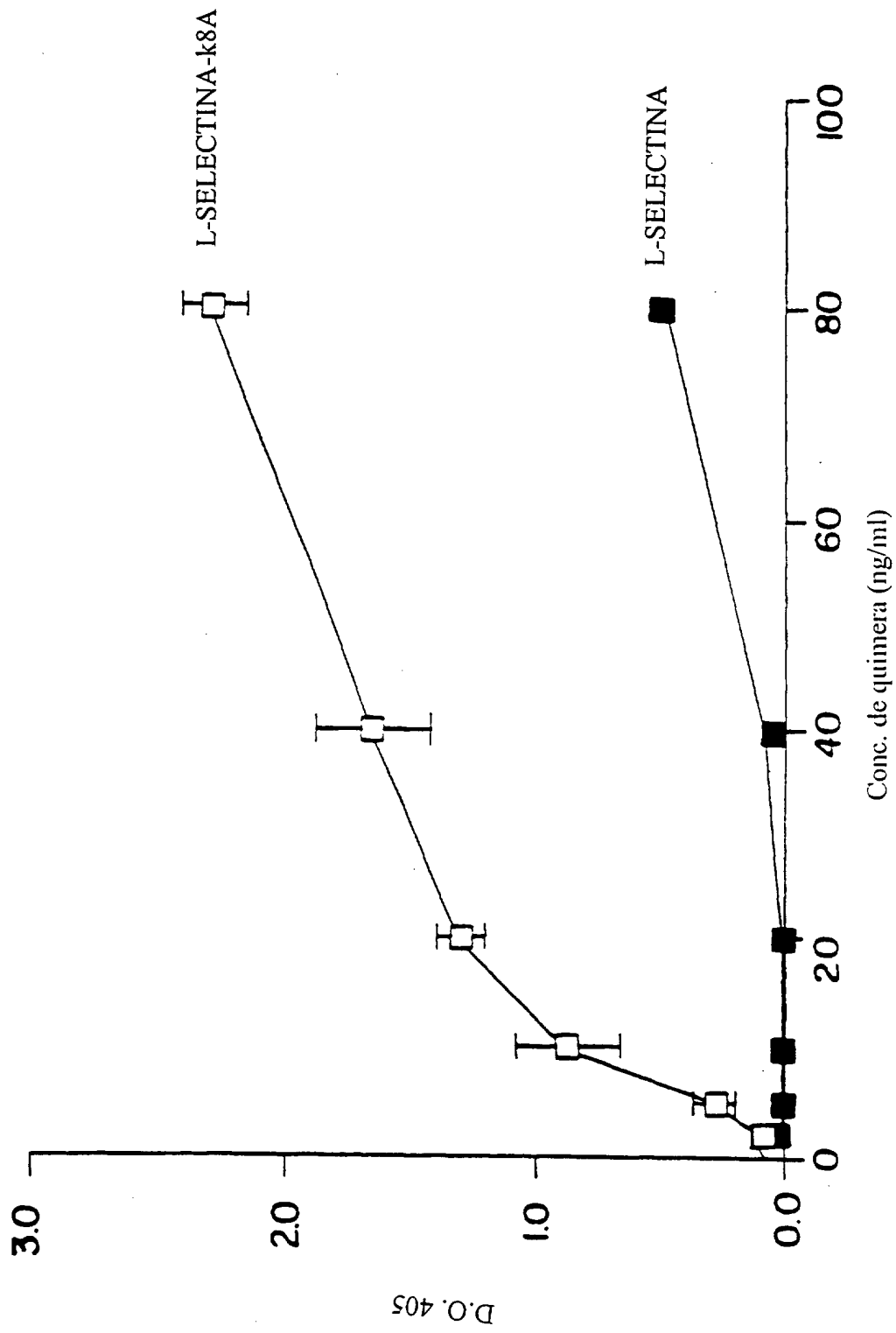

L-SELECTINA-k8A
L-SELECTINA
D.O. 405
3.0
2.0
1.0
0.0
0
20
40
60
80
100
Conc. de quimera (ng/ml)

FIG.8

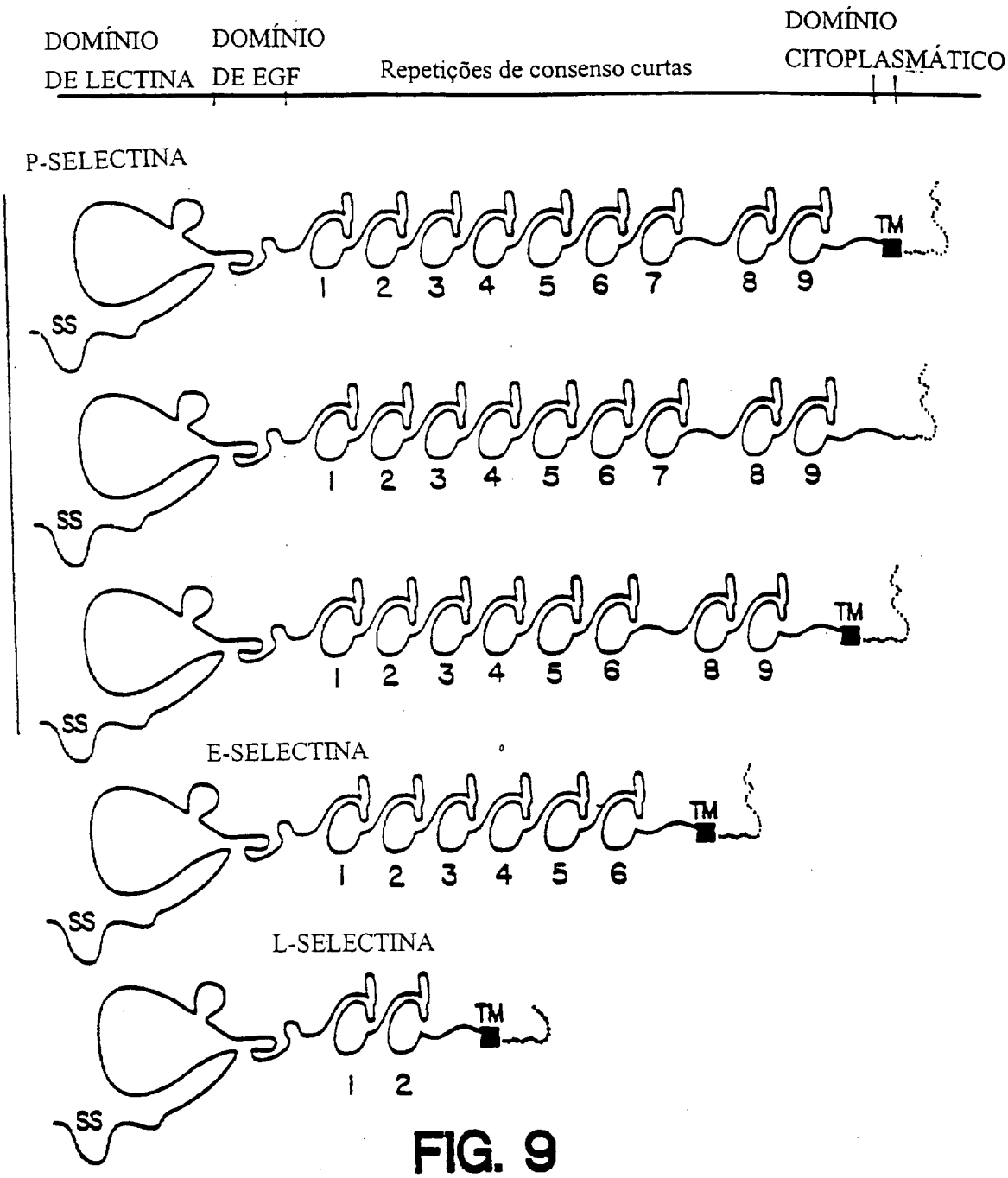

DOMÍNIO DE LECTINA
DOMÍNIO DE EGF
Repetições de consenso curtas
DOMÍNIO CITOPLASMÁTICO
P-SELECTINA
SS
1 2 3 4 5 6 7 8 9
TM
SS
1 2 3 4 5 6 7 8 9
SS
1 2 3 4 5 6 8 9
TM
SS
E-SELECTINA
1 2 3 4 5 6
TM
SS
L-SELECTINA
1 2
TM
SS

FIG. 9

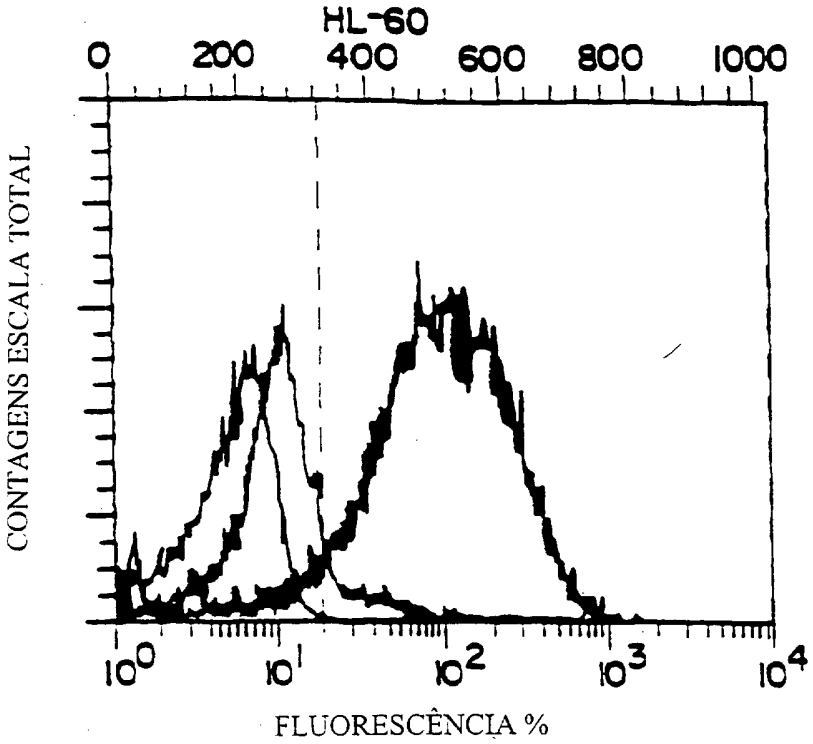


FIG.10A

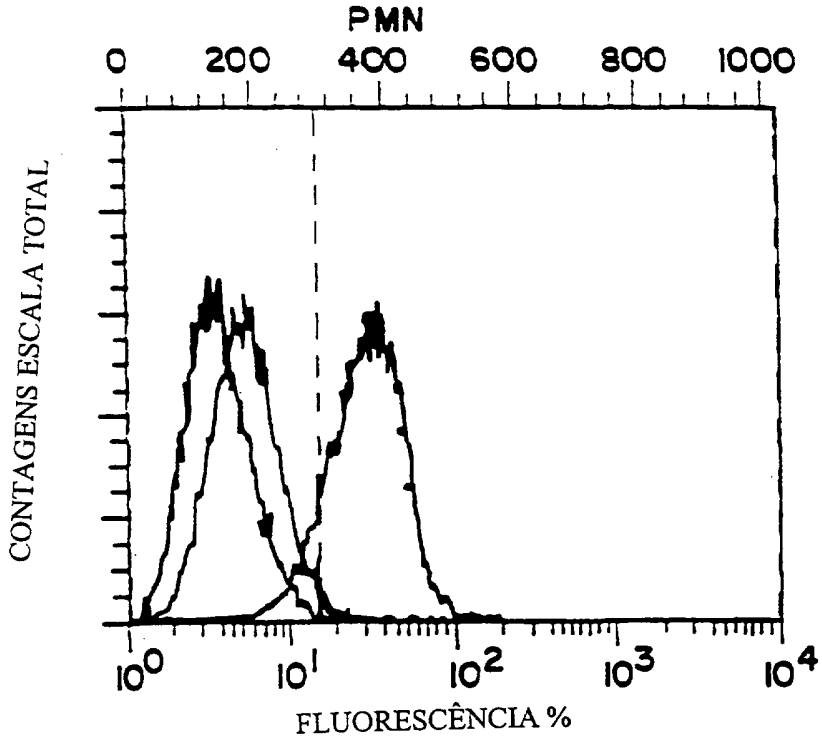


FIG.10B

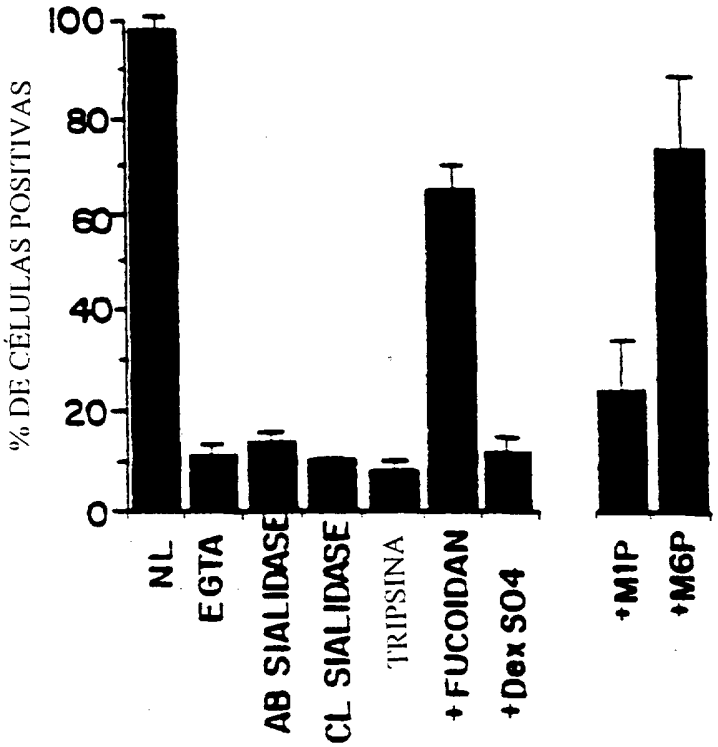


FIG.10C

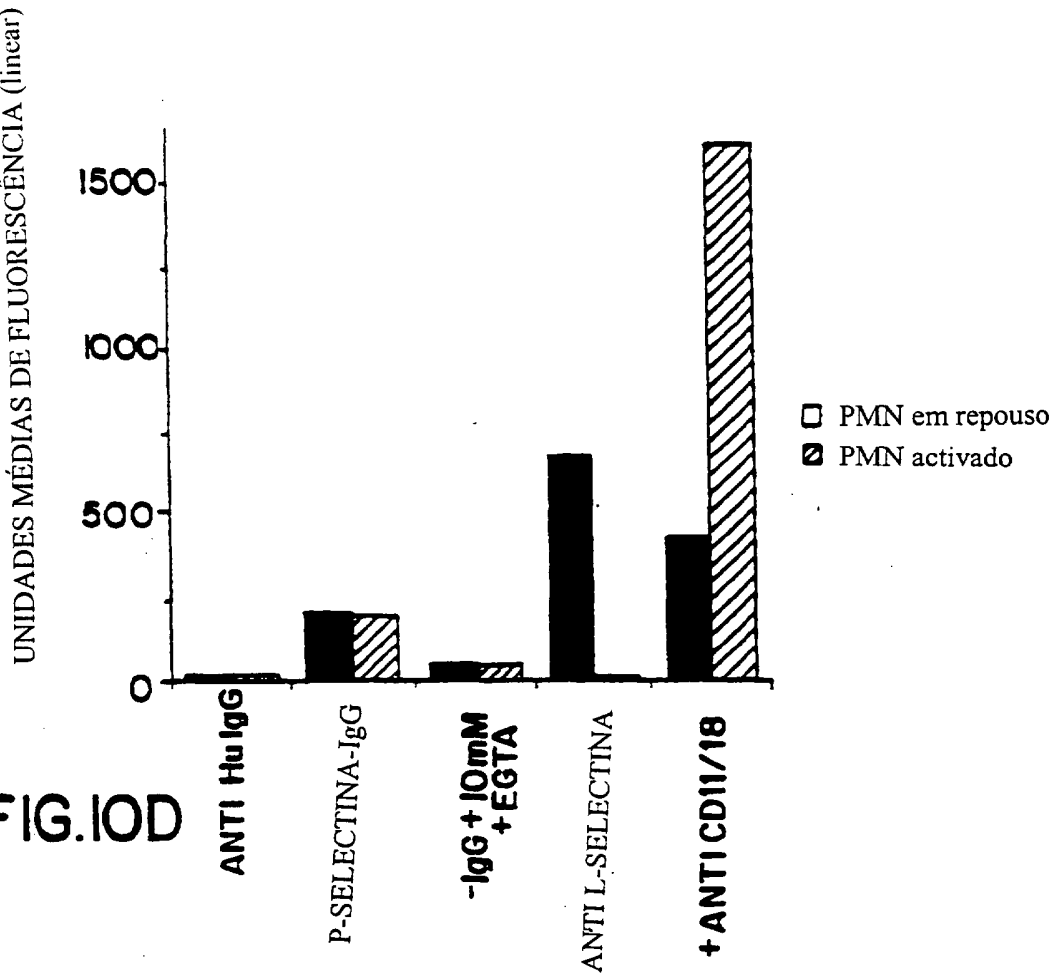


FIG.10D

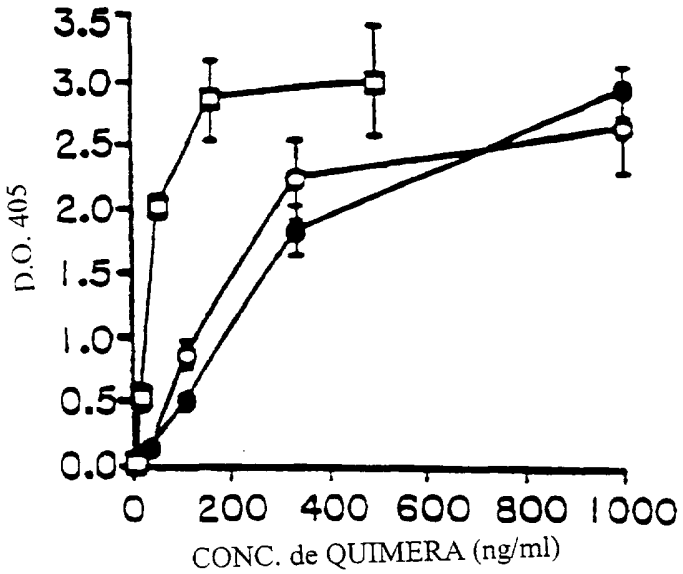


FIG. 11A

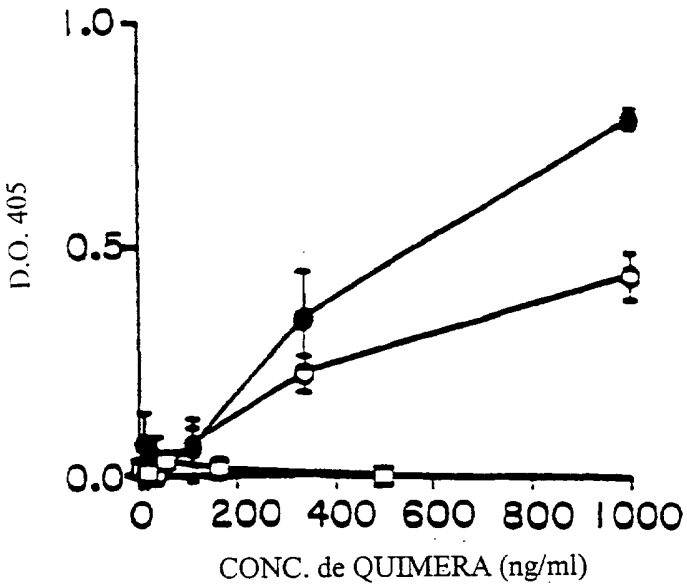


FIG. 11B

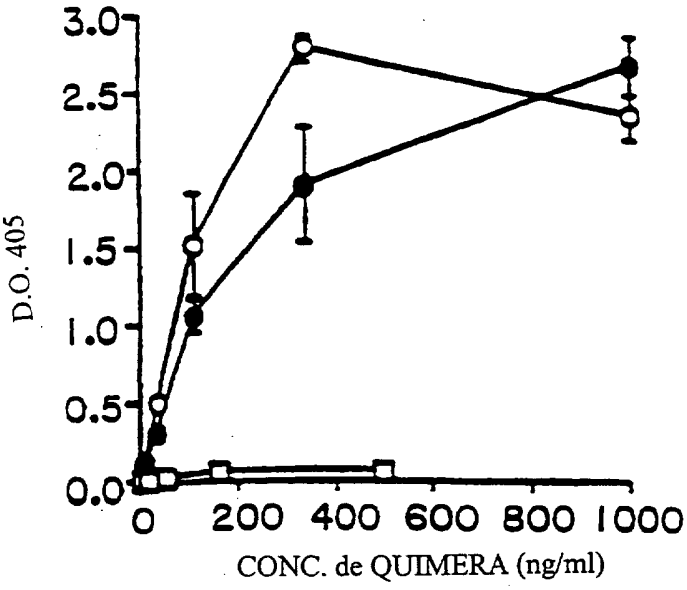


FIG. 11C

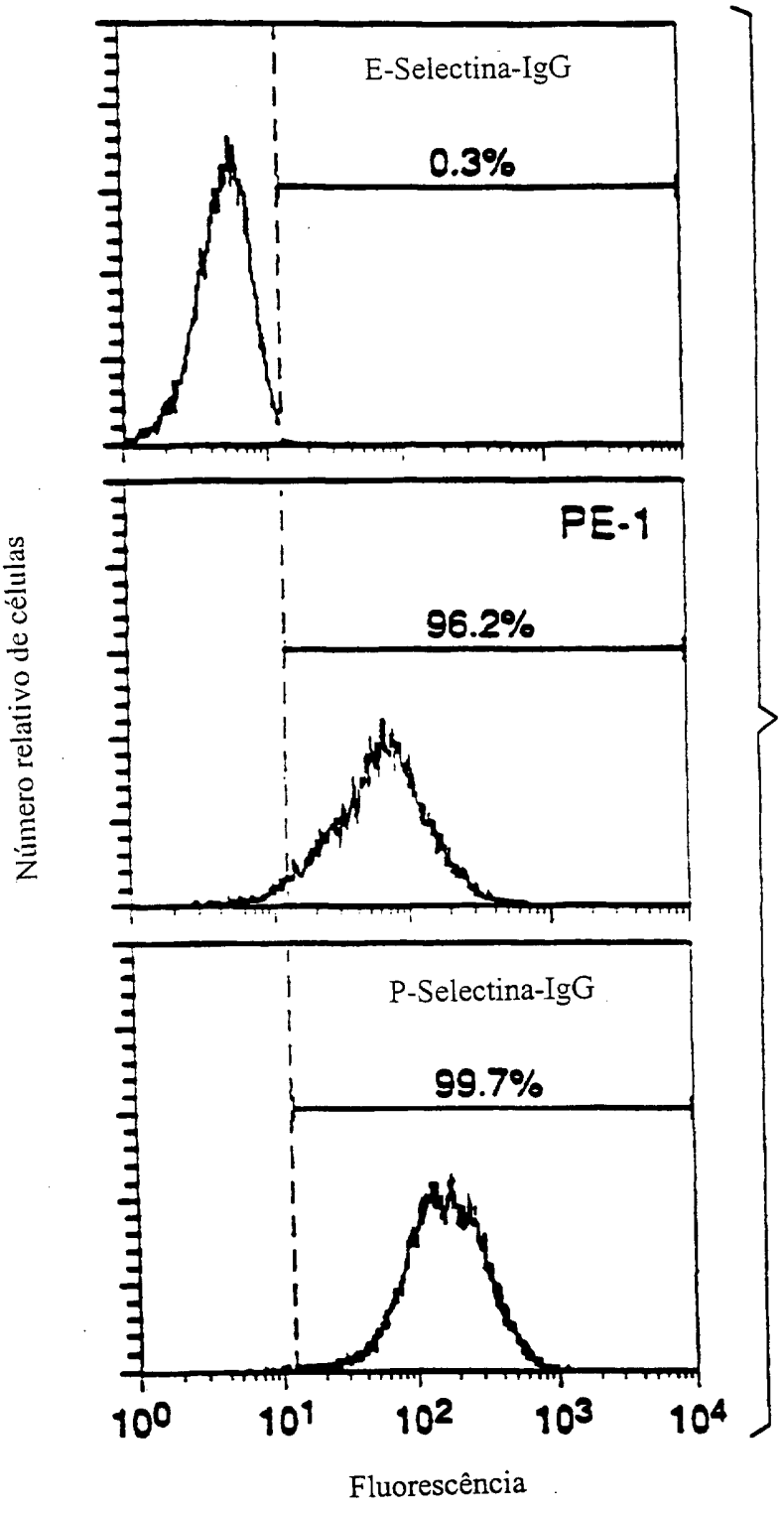

E-Selectina-IgG
0.3%
PE-1
96.2%
P-Selectina-IgG
99.7%
Número relativo de células
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Fluorescência

FIG. 12



FIG. 13A



FIG. 13B

FIG. 14

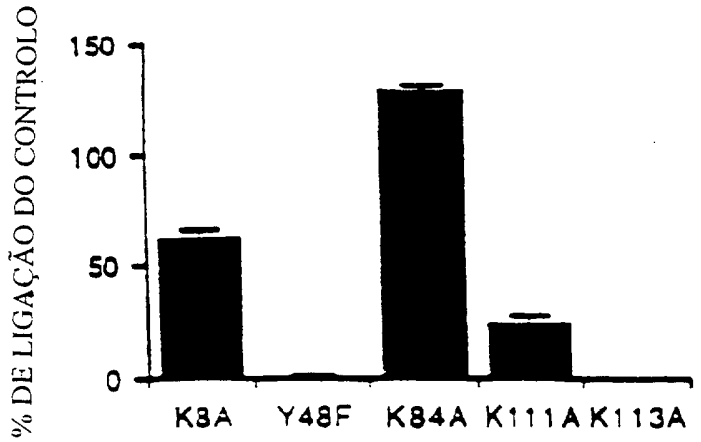


FIG. 15A

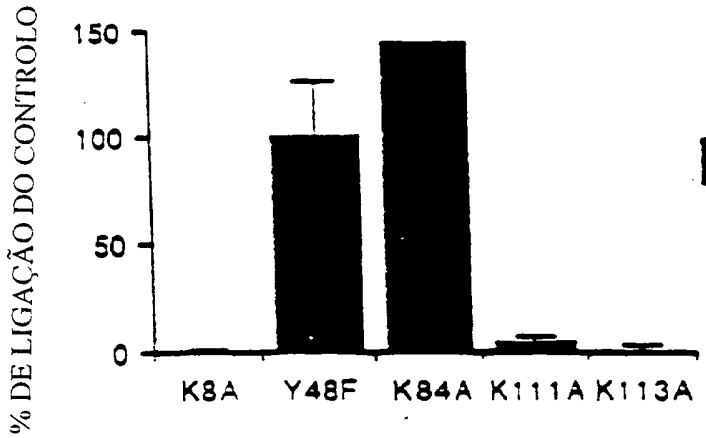


FIG. 15B

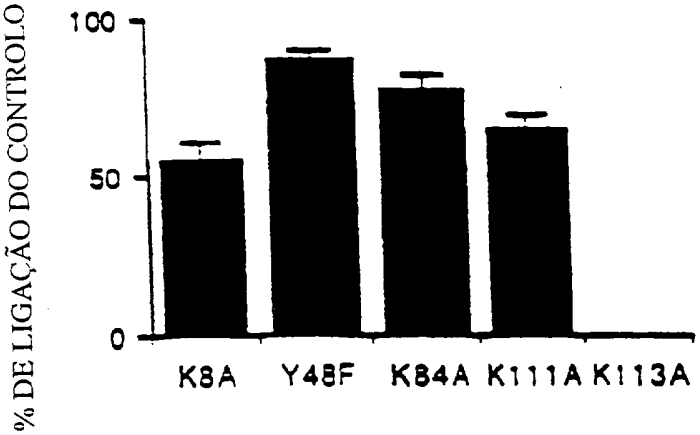


FIG. 15C



FIG. 15D

FIG. 16A

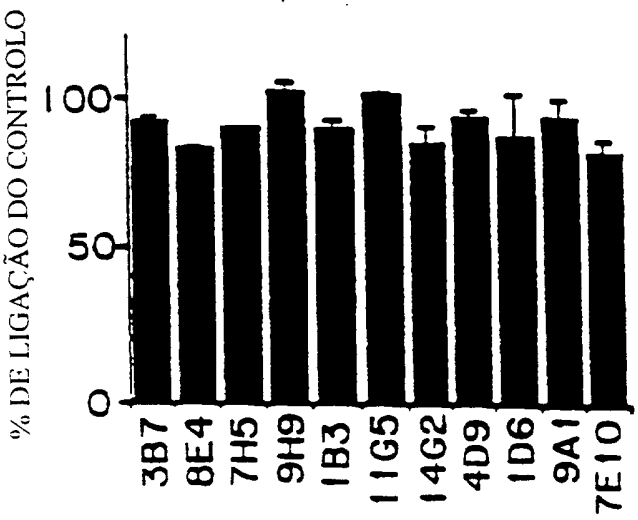


FIG. 16B

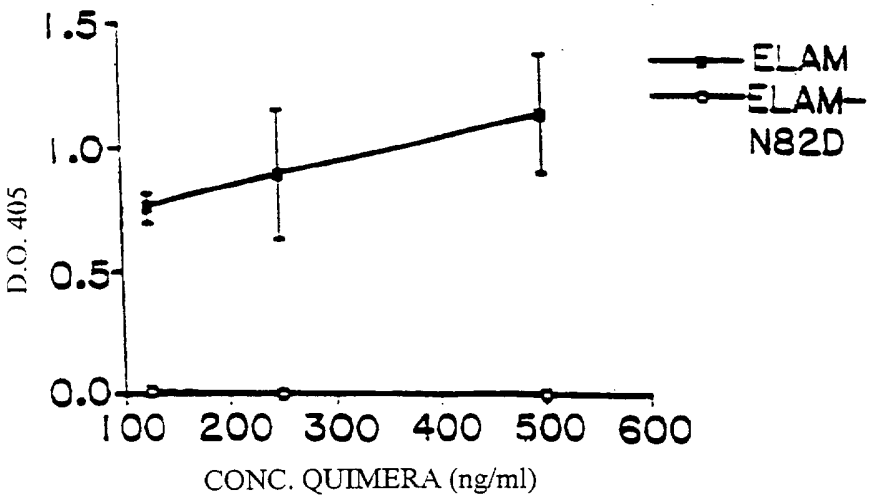


FIG. 16C

