



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 295 134**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01908035 .7**

(86) Fecha de presentación : **09.02.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1254239**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **06.11.2002**

(54) Título: **Fosfolipasa A2 grupo III secretada por mamíferos.**

(30) Prioridad: **11.02.2000 US 181765 P**
09.02.2001 US 781100

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

(73) Titular/es: **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)**
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cédex 16, FR

(72) Inventor/es: **Lazdunski, Michel;**
Lambeau, Gérard y
Valentin, Emmanuel

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Fosfolipasa A2 grupo III secretada por mamíferos.

La presente invención se refiere a ADN y secuencias de péptidos que codifican una nueva sPLA₂ grupo III segregada por mamíferos y más particularmente a una nueva sPLA₂ grupo III (hGIII) segregada de seres humanos. La invención se refiere también al uso de esta enzima en métodos para examinar diversos compuestos químicos.

En años recientes, se ha comprendido que las fosfolipasas A2 (PLA₂, EC 3.1.14) forman una superfamilia de enzimas intracelulares y segregadas, que catalizan todas la hidrólisis de glicerofosfolípidos en la posición *sn*-2 para liberar ácidos grasos y lisofosfolípidos (1-4). Hasta la fecha, se han clonado 8 fosfolipasas A₂ segregadas por mamíferos distintas (sPLA₂s) y clasificado en los grupos I, II, V y X (2, 4-9). Aunque no se ha definido todavía claramente el papel biológico de cada una de estas enzimas, las sPLA₂s de mamífero se han implicado en diversas funciones fisiológicas y patofisiológicas que incluyen digestión de lípidos, proliferación celular, neurosecreción, liberación de mediadores de lípidos proinflamatorios, defensa antibacteriana, enfermedades de cáncer e inflamatorias (3, 4). El nivel de identidad entre las 8 sPLA₂s de mamífero puede ser tan bajo como el 23% (8), pero tienen en común una masa molecular baja (14-17 kDa), la presencia de varios disulfuros, un mecanismo catalítico dependiente de Ca²⁺ similar y una estructura tridimensional total bien conservada (10-13).

Se han descrito también numerosas sPLA₂s en venenos de animales vertebrados e invertebrados tales como serpientes y abejas (14, 15). De manera similar a las sPLA₂s de mamífero, las enzimas de veneno de serpiente se han clasificado en los grupos I y II, y tienen todas un mecanismo catalítico común y una estructura tridimensional muy similar (1, 10-13). Las sPLA₂s de veneno de serpiente son a menudo neurotoxinas o miotoxinas, pero pueden promover también efectos fisiológicos tales como migración de células y proliferación celular (14, 16, 17). Usando como ligandos sPLA₂s de veneno, se han identificado diferentes tipos de receptores de sPLA₂ (4). Estos receptores están implicados probablemente en toxicidad de sPLA₂ de veneno, y estudios recientes han sugerido que las sPLA₂s de mamífero pueden ser los ligandos endógenos normales (4, 8, 19). Las sPLA₂s de veneno de invertebrados son también proteínas ricas en disulfuro, pero tienen una estructura primaria distinta de las sPLAs de mamíferos y de veneno y se han clasificado en los grupos III y IX (2, 4). Se han encontrado en venenos de abeja, escorpión, medusa y caracol marino (20-25), y la sPLA₂ de veneno de abeja grupo III ha sido la enzima mejor estudiada. Esta sPLA₂ se ha clonado (20) y la determinación de su estructura tridimensional (11) ha revelado importantes diferencias con las sPLA₂s grupos I y II, aunque el lugar catalítico es similar al de las sPLA₂s de vertebrados (13). De manera interesante, se descubrieron sPLA₂s similares a la enzima de abeja en veneno de lagarto (26, 27), indicando que las sPLA₂s grupo III existen también en vertebrados, y pueden tener lugar así también en mamíferos.

En los últimos tres años, una búsqueda sistemática de homólogos de sPLA₂ en bases de datos nucleicas ha permitido al solicitante clonar cuatro nuevas sPLA₂s de mamífero que pertenecen a los grupos II y X (6-8). Usando la misma estrategia, el solicitante identificó una secuencia genómica humana que presenta una homología significativa con la sPLA₂ grupo III de veneno de abeja. Se informa aquí de la clonación, organización genómica, representación del mapa cromosómico, distribución en tejidos y expresión heteróloga de la primera sPLA₂ grupo III humana.

Así, la invención se refiere a sPLA₂ grupo III segregada por mamíferos constituida por, o que comprende, la secuencia de aminoácidos en la lista de secuencias con el número SEQ ID No. 2. Más particularmente, la sPLA₂ grupo III segregada por mamíferos es una sPLA₂ grupo III segregada por seres humanos.

La invención se refiere a una molécula de ácido nucleico constituida por una secuencia nucleica que codifica una sPLA₂ grupo III segregada por mamíferos cuya secuencia de aminoácidos está representada en la lista de secuencias del apéndice con el número SEQ ID No. 2. La invención se refiere más particularmente a una molécula de ácido nucleico constituida por o que comprende la secuencia de la lista de secuencias del apéndice con el número SEQ ID No. 1. Evidentemente, la invención se refiere también a secuencias de nucleótidos derivadas de la secuencia anterior, por ejemplo de la degeneración del código genético, y que codifican proteínas que presentan características y propiedades de sPLA₂ grupo III segregada.

Otro propósito de la presente invención son anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra una sPLA₂ grupo III segregada de la invención. Estos anticuerpos pueden prepararse por los métodos descritos en la bibliografía. Según las técnicas anteriores, se forman anticuerpos policlonales por inyección de proteínas, extraídas del epitelio o producidas por transformación genética de un hospedante, en animales, y recuperación posterior de antiseros y anticuerpos de los antiseros, por ejemplo por cromatografía de afinidad. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse fusionando células de mieloma con células de bazo de animales inmunizados previamente usando los receptores de la invención. Estos anticuerpos son útiles en la búsqueda de nueva sPLA₂ grupo III de mamífero segregada o los homólogos de esta enzima en otros mamíferos o de nuevo para estudiar la relación entre la sPLA₂ grupo III segregada de diferentes individuos o especies.

La invención se refiere también a un vector que comprende al menos una molécula de ácido nucleico anterior, ventajosamente asociada con secuencias de control adaptadas, junto con una producción o proceso de expresión en un hospedante celular de una sPLA₂ grupo III de la invención o un fragmento de ella. La preparación de estos vectores, así como la producción o expresión en un hospedante proteínico de la invención puede realizarse por técnicas de biología molecular e ingeniería genética muy conocidas por el profesional.

Puede usarse también una molécula de ácido nucleico que codifica una sPLA₂ grupo III segregada de mamífero o un vector según la invención para transformar animales no humanos y establecer un linaje de animales transgénicos no humanos. El vector usado se escoge en función del hospedante al que se ha de transferir; puede ser cualquier vector, tal como un plásmido. Así, la invención se refiere también a hospedantes celulares que expresan sPLA₂ grupo III segregada por mamífero obtenida de conformidad con los procedimientos precedentes.

Las moléculas de ácido nucleico según la invención pueden usarse para preparar sondas de ácido nucleico y oligonucleótido. Estas sondas, marcadas ventajosamente, son útiles para detección por hibridación de sPLA₂ grupo III similar en otros individuos o especies. Según las técnicas anteriores, estas sondas se ponen en contacto con una muestra biológica. Pueden usarse diferentes técnicas de hibridación, tales como hibridación por transferencia puntual o hibridación de réplicas (técnica de Southern) u otras técnicas (chips de ADN). Tales sondas constituyen las herramientas que hacen posible detectar rápidamente secuencias similares en los genes que codifican sPLA₂ grupo III que permiten estudiar la presencia, origen y conservación de estas proteínas. Las sondas de oligonucleótido son útiles para experimentos de PCR, por ejemplo para buscar genes en otras especies o con un propósito de diagnóstico.

Las sPLA₂ se expresan en una variedad de tejidos en condiciones normales y patológicas (incluyendo enfermedades inflamatorias, cánceres, isquemia cardíaca y cerebral, etc.) y están implicadas en una miríada de papeles fisiológicos y patológicos. Estas proteínas también están implicadas en proliferación celular, migración de células, angiogénesis, contracción de células, apoptosis, neurosecreción, coagulación de sangre, adipogénesis, metabolismo de lípidos (digestión, barrera de lípidos de la piel y formación de tensioactivos del pulmón, metabolismo de lipoproteínas, ...), espermatogénesis, fecundación y embriogénesis. También juegan un papel en defensa del hospedante y tienen propiedades antivíricas y antibacterianas contra virus tipo VIH-1 y diversas cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. También están implicadas en diversos estados patológicos tales como daño pulmonar agudo, síndrome de dolor respiratorio agudo, enfermedad de Crohn y diversos tipos de cánceres en los que sPLA₂ puede actuar como supresor génico.

En consecuencia, esta invención también puede ser útil en métodos *in vitro* para identificar compuestos activos biológicamente con propiedades anti-inflamatorias o más generalmente para identificar compuestos que modulan actividades biológicas de sPLA₂ como se ha listado antes.

Tales compuestos activos biológicamente pueden identificarse determinando si un compuesto seleccionado es capaz de inhibir la actividad catalítica de sPLA₂ dividiendo un fosfolípido para liberar ácidos grasos y lisofosfolípidos en un ensayo de micelas mezcladas, un ensayo de liposomas, un sistema que utilice membranas naturales o en células completas que sobreexpresan esta enzima. Un compuesto capaz de inhibir actividad catalítica de sPLA₂ puede ser anti-inflamatorio o puede comportarse como un antagonista de sPLA₂ en las actividades biológicas de sPLA₂ listadas antes.

Por ejemplo, puede realizarse un examen en compuestos de actividad anti-inflamatoria potencial con las nuevas enzimas sPLA₂ de esta invención, purificadas hasta homogeneidad a partir de fuentes de células o producidas recombinantemente o sintéticamente. Un compuesto seleccionado puede añadirse a una enzima sPLA₂ de esta invención en un ensayo de micelas mezcladas, un ensayo de liposomas o un sistema de ensayo que utilice membranas naturales, y analizarse la inhibición de la actividad de sPLA₂. Alternativamente, un compuesto seleccionado puede añadirse a células completas que sobreexpresan la sPLA₂ y examinarse en las células la inhibición de liberación de ácidos grasos o lisofosfolípidos. En este caso, pueden cultivarse células normales y células que sobreexpresan sPLA₂ en ácido araquidónico marcado. Se mide la señal entre los productos segregados por las células normales y las que sobreexpresan para proporcionar una línea de base de expresión de sPLA₂. Se añade después un compuesto seleccionado a los cultivos y se desarrollan los cultivos en ácido araquidónico con marca. Si hay una diferencia en la señal (por ejemplo, la cantidad de ácido araquidónico producido) en las células en presencia del compuesto, este compuesto inhibe la actividad de sPLA₂ y puede ser un compuesto anti-inflamatorio potencial.

También pueden identificarse compuestos activos biológicamente examinando en los compuestos seleccionados sus propiedades de unión a receptores de sPLA₂ que se unen a sPLA₂s grupo III de esta invención. Estos receptores incluyen la familia de receptores tipo N que están implicados probablemente en varias actividades biológicas de sPLA₂s incluyendo propiedades antivíricas de VIH-1. Por ejemplo, pueden usarse sPLA₂s marcadas radioactiva o fluorescentemente en ensayos de unión de competencia, y puede examinarse en los compuestos seleccionados la inhibición de la unión de sPLA₂.

También pueden identificarse compuestos activos biológicamente examinando en los compuestos seleccionados la modulación de un efecto biológico de sPLA₂ tal como los listados antes. Por ejemplo, pueden añadirse sPLA₂s de esta invención a células en presencia o ausencia de un compuesto seleccionado y puede ensayarse en células proliferación celular, migración de células, contracción de células o apoptosis.

En general, otro aspecto de esta invención está relacionado así con el uso de un compuesto identificado primero por los métodos descritos antes. Nuevas composiciones farmacéuticas pueden contener una cantidad eficaz terapéuticamente de un compuesto identificado por un método anterior de esta invención. Estas composiciones farmacéuticas pueden emplearse en métodos para tratar estados de enfermedad o trastornos que implican sPLA₂s grupo III de esta invención.

Otras ventajas y características de la invención resultarán evidentes leyendo los siguientes ejemplos que se refieren a la clonación, organización genómica, representación de mapa cromosómico, distribución en tejidos y expresión heteróloga de la primera sPLA₂ grupo III humana y que se refieren a los dibujos adjuntos en los que:

5 La figura 1 presenta un diagrama esquemático del gen (A) y la secuencia de nucleótidos de cADN (B) de sPLA₂ hGIII. A, La estructura de exones-intrones del gen de sPLA₂ hGIII se muestra en la parte superior y se muestran debajo la secuencia EST y los diferentes productos de PCR de cADN que se han multiplicado para determinar la secuencia del cADN de sPLA₂ hGIII de longitud completa (Panel B). Los exones e intrones se representan como *cajas abiertas* y *líneas rectas*, respectivamente. El codón de iniciación de metionina y el codón de detención del gen de sPLA₂ hGIII
10 están situados en los exones 1 y 7. El dominio de sPLA₂ está codificado por los exones 1 a 4. B, se muestra la secuencia de cADN de consenso. El segmento de péptido señal predicho está *encajonado*. Los cinco lugares de N-glicosilación putativos están *encuadrados*. El dominio de sPLA₂ está *subrayado*. Los límites de exón-intrón se indican por *puntas de flecha*.

15 La figura 2 presenta el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de sPLA₂s grupo III. Se muestran secuencias de proteínas de sPLA₂ maduras. Las secuencias de sPLA₂ son de (20, 22, 23, 25-27). Sólo se ha informado de secuencias parciales para sPLA₂s de medusa y lagarto escorpión (25, 26).

La figura 3 presenta un análisis de manchas de Northern de la distribución en tejidos de sPLA₂ hGIII. Una mancha
20 de Northern comercial que contenía 2 µg de poli A⁺ ARN de diferentes tejidos de adulto humano se hibridó con alto rigor con sonda de ARN de sPLA₂ marcada con [³²P] como se describe en "Experimental Procedures". *sk. musc.*, músculo esquelético; *small intest.*, intestino delgado; *PBL*, leucocitos de sangre periférica. kb, kilobase. La mancha se expuso durante 7 días.

25 La figura 4 presenta las propiedades enzimáticas de sPLA₂ hGIII. A, dependencia de Ca²⁺ de la hidrólisis de vesículas de 1-palmitoil-2-(10-pirenodcanoil)-*sn*-glicerol-3-fosfometanol por sPLA₂ hGIII purificada con Q-Sepharose, B, dependencia del pH de la hidrólisis de vesículas de fosfatidilcolina por sPLA₂ hGIII purificada con Q-Sepharose.

1. Procedimientos experimentales

30 I.1 Clonación molecular de sPLA₂ hGIII

La búsqueda de homólogos de sPLA₂ en bases de datos genéticos guardadas en el National Center for Biotechnology usando el programa de alineamiento de secuencia tBLASTn (28) produjo la identificación de una secuencia genómica
35 humana (clon PAC DJ412A9, número de admisión GenBank AC005005) de 133893 nucleótidos que contenían varias regiones de homología con sPLA₂ grupo III de veneno de abeja. Esto sugirió que este gran clon genómico contiene un gen con varios exones e intrones que codifican una nueva sPLA₂ grupo III humana. Los límites exón-intrón del gen de sPLA₂ humana se dedujeron según el alineamiento con la sPLA₂ de veneno de abeja y secuencias de consenso exón-intrón (29) para proporcionar una secuencia de cADN putativa. Para demostrar la presencia de la secuencia
40 de cADN putativa en tejidos humanos, se realizó un primer grupo de experimentos de RT-PCR (RT-PCR 1 en la Fig. 1) en diferentes cADNs humanos con cebadores que flanquean el lazo de unión a Ca²⁺ y el dominio de lugar activo de la nueva sPLA₂ (los cebadores sentido y antisentido corresponden a los nucleótidos 445 a 468 y 655 a 679, respectivamente, Fig. 1). Un producto de ADN se multiplicó a partir de cADN de pulmón fetal humano y se encontró que tenía una secuencia de nucleótidos correspondiente al cADN putativo. Esta secuencia se usó después para clonar
45 la secuencia de cADN completa mediante experimentos de RACE-PCR 5' y 3' como se ha descrito previamente (7). Brevemente, Poli A⁺ ARN fetal humano (2 µg, Clontech) se transcribió inversamente, y se ligó cADN de doble cadena a adaptadores que contenían secuencias de los cebadores universales SP6 y KS. Las reacciones de PCR se realizaron usando cebador KS y un cebador delantero o inverso específico, para RACE-PCR 3' o 5', respectivamente. Los productos de PCR se subclonaron en vector Easy PGEM-T (Promega), y se examinaron colonias usando una
50 sonda de oligonucleótidos marcada con [³²P] interna. Los experimentos de RATE-PCR 3' condujeron a la clonación de una secuencia de 1458 nucleótidos que contenía en su extremo 3' una extensión enmarcada de 304 aminoácidos, un codón de detención y una región no codificante 3' de 546 nucleótidos que contenía un lugar de poliadenilación putativo. La búsqueda en bases de datos EST produjo la identificación de una secuencia EST (Genbank AI282787), y la determinación de secuencia total de este clon de EST reveló una secuencia de 193 nucleótidos que contenía una
55 secuencia de 166 nucleótidos idéntica en su extremo 5' al clon genómico y una secuencia poliA de 27 nucleótidos. Se realizaron experimentos de RACE-PCR 5' con un cebador antisentido (nucleótidos 518-545 en la Fig. 1) y condujeron a la clonación de una secuencia de 158 nucleótidos, que extendía la secuencia del extremo 5' del fragmento de ADN de RT-PCR 1 en 20 residuos de aminoácidos. Enmarcada con esta secuencia de 158 nucleótidos, se encontró una metionina iniciadora seguida por una secuencia de 19 aminoácidos que presentaba las características de una secuencia
60 de péptido señal (30) en la secuencia genómica aguas arriba. Se diseñaron un cebador aguas arriba de la metionina iniciadora putativa (nucleótidos -254 a -229 en la Fig. 1) y un cebador antisentido (nucleótidos 2205 a 2236 en la Fig. 1) derivado de la secuencia EST anterior y se usaron para multiplicar la sPLA₂ de cADN hGIII de longitud completa (RT-PCR 2 en la Fig. 1). Este experimento de RT-PCR se realizó en el mismo cADN de pulmón fetal humano usando la Polimerasa de ADN *Pwo* correctora y condujo a la clonación de un fragmento de cADN de 2564 nucleótidos que
65 contenía un marco de lectura abierto de 1530 nucleótidos. Para confirmar que este marco de lectura abierto largo resultaba de un empalme apropiado del gen de sPLA₂ hGIII, se realizaron experimentos de captura de exón. Para este fin, un fragmento genómico que abarcaba el gen de hGIII putativo se multiplicó con el sistema de PCR de plantilla larga Expand (Roche), cebadores diseñados a partir del clon de PAC humano DJ412A9 (nucleótidos 36143-36175

y 43062-43092 para cebadores sentido y antisentido, respectivamente), y ADN genómico humano como platilla. Un fragmento genómico de 6,95 kilopares de bases esperado se multiplicó y subclonó en el vector pET01 de captura de exón (MoBiTech), se determinó la secuencia parcialmente, y el plásmido resultante se transfeció en células COS. Tres días después de la transfección, se preparó ARN total, se transcribió inversamente con oligodT y se sometió a PCR con cebadores que flanqueaban el marco de lectura abierto de sPLA₂ hGIII. Un fragmento de PCR de 1530 nucleótidos se multiplicó, se clonó en vector Easy pGEM-T (Promega) y se encontró que codificaba el marco de lectura abierto de hGIII de longitud completa. No se observó multiplicación con cADN de células COS transfectadas con el vector de captura de exón progenitor.

1.2 Análisis de la distribución en tejidos de sPLA₂ hGIII

Una mancha de Northern humana (catálogo Clontech 7780-1) se sondó con una ribosonda marcada con [³²P] correspondiente a la secuencia de nucleótidos 445 a 679 de sPLA₂ hGIII (Fig. 1) en tampón de hibridación ULTRAHyb (Ambion, catálogo 8670) durante 18 h a 70°C. La ribosonda antisentido desprendible de alta sensibilidad se sintetizó usando el juego Ambion de ARN Strip-EZ (catálogo 1360). La mancha se lavó hasta un rigor final de 0,1 X SSC (NaCl 30 mM, citrato trisódico 3 mM, pH 7,0) en 0,1% de SDS a 70°C y se expuso a películas Kodak Biomax MS con una pantalla intensificadora transpantalla-HE.

1.3 Expresión recombinante de sPLA₂ hGIII en células COS

La secuencia de cADN de longitud completa que codifica sPLA₂ hGIII se subclonó en el vector de expresión pRc/CMVneo (Invitrogen) y se añadió una secuencia Kozak de consenso para aumentar la expresión de proteína como se ha descrito previamente (6). Se determinó la secuencia de la construcción de ADN después de subclonar y se transfeció transitoriamente en células COS usando DEAE-dextrano (7). Cinco días después de la transfección, se recogió el medio de células y se purificó parcialmente en una columna de intercambio aniónico. Brevemente, el medio de cultivo de células COS (9 ml) se cargó a razón de 1 ml/min en una columna de 10 ml de Q-Sepharose Fast Flow (Farmacia) equilibrada previamente en Tris 25 mM, pH 8,0 a 4°C. Después de lavar con tampón de equilibración seguidos por un gradiente lineal de NaCl, de NaCl 0 a 1 M durante 40 min). Se detectó la actividad enzimática de sPLA₂ hGIII usando el ensayo fluorimétrico con 1-palmitoil-2-(10-pirenodecanoil)-sn-glicero-3-fosfometanol como se ha descrito (8). El agrupamiento de fracciones que contenían hGIII se concentró aproximadamente 10 veces por ultrafiltración centrífuga (membrana YM-10, Amicon) a 4°C, y el concentrado se guardó a -20°C. Usando este ensayo, no se detectó actividad de fosfolipasa A₂ en medio de cultivo de células COS transfectadas con el vector de expresión progenitor.

1.4 Estudios de actividad de PLA₂

Se realizaron como se describe en (8) estudios para medir la velocidad inicial de hidrólisis de pequeñas vesículas unilaminares de fosfatidilglicerol (1-palmitoil-2-([9, 10³H])-palmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol en 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol a razón de 50 Ci/mol) y fosfatidilcolina (1-palmitoil-2-([9, 10³H])-palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 50 Ci/mol) usando sPLA₂ hGIII purificada con Q-Sepharose. Las velocidades iniciales se calcularon a partir de 3 puntos de tiempo en la porción lineal de la curva de producto frente al tiempo. Se obtuvieron perfiles de pH-velocidad para la hidrólisis de fosfatidilcolina como se ha descrito, (8). La dependencia de Ca²⁺ de la hidrólisis de fosfolípido se realizó con el ensayo fluorimétrico (descrito antes) con EGTA 10 μM (sin Ca²⁺) o con CaCl₂ en exceso de EGTA para dar Ca²⁺ 10-650 μM.

II. Resultados y discusión

II.1 Clonación molecular de sPLA₂ hGIII

El examen de bases de datos de secuencias nucleicas de mamífero con diversas sPLA₂s de veneno condujo a los inventores a identificar un fragmento genómico humano grande de 133893 nucleótidos que presentan varias regiones de homología con la sPLA₂ grupo III de veneno de abeja. Esto sugirió que el clon genómico contiene un gen completo con varios exones e intrones que codifica una sPLA₂ grupo III humana (hGIII) putativa. Se diseñó un primer grupo de cebadores sentido y antisentido a partir de las secuencias genómicas homólogas a sPLA₂ de veneno de abeja y se usaron para experimentos de RT-PCR (RT-PCR 1 en la Fig. 1A) en cADNs humanos de cerebro, páncreas, bazo, músculo esquelético y pulmón fetal. Se multiplicó un fragmento de ADN de cADN de pulmón fetal y se encontró que su secuencia correspondía a los exones empalmados esperados de la secuencia genómica. Experimentos de RACE-PCR 5' y 3' seguidos por una segunda ronda de RT-PCR (RT-PCR 2 en la Fig. 1A) en cADN de pulmón fetal humano condujeron a la clonación de un fragmento de cADN de 2564 nucleótidos que contenía un marco de lectura abierto grande de 1530 nucleótidos (véanse la Fig. 1 y los Procedimientos experimentales para tener detalles). El examen de bases de datos EST produjo la identificación de una secuencia EST humana simple (Genbank AI282787) de 193 nucleótidos que contiene una cola poliA, sugiriendo que esta secuencia EST corresponde al extremo 3' del mRNA de sPLA₂ hGIII (Fig. 1A). La comparación de la secuencia de cADN de 2564 nucleótidos con la secuencia genómica PAC indicó que el gen de sPLA₂ hGIII está compuesto por al menos 7 exones y 6 intrones que se extiende aproximadamente 7 kilopares de bases (Fig. 1A). Se realizaron experimentos de captura de exones y se encontró que confirmaban la estructura exón-intrón y la secuencia del marco de lectura abierto de sPLA₂ hGIII completo de 1530 nucleótidos (véanse Procedimientos experimentales). El clon de PAC DJ412A9 (Genbank AC005005) que contenía el gen de sPLA₂ hGIII se generó por el programa de determinación de secuencia del cromosoma humano 22 (31),

indicando que el gen de sPLA₂ hGIII delimita a este cromosoma entre los marcadores de Genethon D22S1150 y D22S273. La localización del gen de hGIII es así distinta de las de genes para sPLA₂s de grupos IB, IIA, IID, V y X humanas (8, 9).

De modo similar a otras sPLA₂s de mamífero, el marco de lectura abierto de sPLA₂ hGIII comienza con un péptido señal de 19 aminoácidos (30), indicando que podría segregarse la nueva enzima. En contraste con otras sPLA₂s de mamífero (117 a 148 aminoácidos), el marco de lectura abierto de hGIII codifica una proteína mucho mayor de 490 aminoácidos (masa molecular calculada 55,3 kDa, pI calculado 9,1) que contenía cinco lugares de N-glicosilación putativos (Fig. 1B). Esta proteína está formada por un dominio de sPLA₂ central (141 residuos) flanqueado por regiones N- y C-terminales (130 y 219 residuos, respectivamente). En base al alineamiento con las sPLA₂s grupo III de veneno (Fig. 2), el dominio de sPLA₂ comprende 141 aminoácidos (masa molecular calculada 16 kDa, pI calculado 5,4) y muestra los aspectos típicos de las sPLA₂s grupo III incluyendo las 10 cisteínas específicas para sPLA₂s grupo III y los residuos clave del lazo de Ca²⁺ y el lugar catalítico. El dominio de sPLA₂ contiene 2 lugares de N-glicosilación putativos que no están conservados con el de sPLA₂ de veneno de abeja situado en posición 15 en la Fig. 2. Sin embargo, uno de ellos está situado sólo 4 residuos aguas abajo del lugar de glicosilación en sPLA₂ de veneno de abeja. De manera interesante, el dominio de hGIII es más similar a sPLA₂ grupo III de veneno identificadas en vertebrados. Realmente, se encuentran mayores niveles de identidad con las isoformas PA-2 y PA-5 (43% y 46%, respectivamente) purificadas del lagarto *Gila monster* (27), mientras que se observan menores niveles con sPLA₂s grupo III de veneno de abeja de la miel, abejorro y el escorpión *Pandinus imperator* (Fig. 2).

No podían encontrarse entradas en bases de datos de proteínas con homología significativa a las regiones N- y C-terminales que flanquean el dominio de sPLA₂ del gen de sPLA₂ hGIII. Son ambas básicas (pI calculados 9,1 y 11,3 para las regiones N- y C-terminal, respectivamente) y contienen de 4 a 8 cisteínas, sugiriendo que pueden plegarse separadamente a partir del dominio de sPLA₂. La función de estos dos dominios es completamente desconocida actualmente. Una posibilidad es que estos dominios podrían estar implicados en la maduración de sPLA₂ hGIII durante o después de su secreción desde las células. Aunque el proceso de maduración de sPLA₂ hGIII permanece claramente por elucidar, la presencia de un doblete KR básico en el extremo del dominio N-terminal (Fig. 1B) sugiere que este dominio podría servir como propéptido largo que puede dividirse por proteína convertasa tipo subtilisina en el aparato de Golgi (32). De manera interesante, la secuencia de la proteína madura de sPLA₂ de veneno de abeja está precedida por un residuo de arginina (20) y se ha encontrado una secuencia de propéptido corta que termina con un doblete de arginina en sPLA₂ grupo X humana (6). La región C-terminal contiene también varios residuos básicos incluyendo dobletes básicos, que pueden estar implicados también en maduración de proteínas. Además, el dominio C-terminal contiene numerosas prolinas y un pentapéptido RRLAR similar al encontrado en Imperatoxina I de veneno de *Pandinus imperator* (22). A este respecto, no está claro todavía si algunas sPLA₂s de grupo III de veneno tienen también tales regiones N- y C-terminales grandes, porque sólo se han determinado hasta ahora secuencias de proteína madura y secuencias de cADN parciales (20, 23, 25-27), excepto para las sPLA₂s de veneno de *Pandinus imperator* (22, 24). Una segunda posibilidad puede ser que los dominios N- y C-terminales estén implicados en dimerización de sPLA₂, fijación de objetivo de células o interacción con proteínas celulares incluyendo posiblemente receptores de sPLA₂ (4). La última posibilidad puede ser que estos dominios jueguen un papel en regulación de la actividad de sPLA₂ hGIII. A diferencia de las sPLA₂s grupo I y II que contienen una red de enlaces de hidrógeno que enlaza el término N con residuos catalíticos, la estructura de rayos X de la sPLA₂ de veneno de abeja muestra que el término N no forma parte de la estructura de lugares activos (11). Realmente, la sPLA₂ de veneno de abeja recombinante expresada como proteína de fusión N-terminal presenta la misma actividad catalítica que la fusión dividida o la enzima nativa (33). Esto sugiere que la presencia de la extensión N-terminal (y presumiblemente la región C-terminal que tampoco forma parte del lugar catalítico (11)) no interferiría con la actividad catalítica de sPLA₂ hGIII. sPLA₂ hGIII de longitud completa o dividida parcialmente puede ser así activa catalíticamente y los dominios N- y C-terminales pueden participar en las propiedades enzimáticas de hGIII. Se necesitan claramente estudios adicionales para elucidar el proceso de maduración de la proteína de sPLA₂ hGIII y el papel de estas regiones N- y C-terminales adicionales.

II.2 Distribución en tejidos de sPLA₂ hGIII

La distribución en tejidos de sPLA₂ hGIII se analizó por hibridación con alto rigor con una mancha e Northern humana (Fig. 3). La sPLA₂ hGIII se expresa como un transcripto simple de 4,4 kilobases que es abundante en riñón, corazón, hígado y músculo esquelético, y también está presente en bajos niveles en placenta y leucocitos de sangre periférica. Se detectó poca o ninguna expresión en cerebro, colon, timo, bazo, intestino delgado y pulmón. El modelo de expresión de sPLA₂ hGIII es distinto del de otras sPLA₂s humanas, sugiriendo que esta nueva enzima tiene función(es) específica(s). Notablemente, sPLA₂ hGIII se expresa en riñón, mientras que no se había detectado previamente expresión en este tejido para sPLA₂s grupos IB, IIA, IID, V y X humanas (6, 9). Por otra parte, sPLA₂ hGIII se co-expresa en corazón con sPLA₂s grupos IIA y V humanas, y en hígado y músculo esquelético con sPLA₂ grupo IIA humana (6).

II.3 Expresión recombinante de sPLA₂ hGIII y propiedades enzimáticas

Cuando el cADN de sPLA₂ hGIII se transfectó transitoriamente en células COS, la actividad de sPLA₂ se acumuló en el medio de cultivo, indicando que el cADN de sPLA₂ hGIII codifica una enzima activa segregada. El nivel de actividad de sPLA₂ medido después de lavar las células con tampón de alto contenido de sal que contenía NaCl 1 M y en lisado de células fue bajo, sugiriendo que la sPLA₂ hGIII no está unida estrechamente a la superficie celular y se

segrega eficazmente. La sPLA₂ hGIII se purificó parcialmente por cromatografía en una columna de flujo rápido de Q-Sepharose y la fracción de sPLA₂ eluída se usó para analizar las propiedades enzimáticas.

Como todas las sPLA₂s de mamífero que se han caracterizado cinéticamente (7, 8, 34, 35), la sPLA₂ hGIII es considerablemente más activa (11 veces en base a las velocidades iniciales) en vesículas de fosfatidilglicerol aniónicas frente a vesículas de fosfatidilcolina con carga positiva y negativa (no mostradas). Se requieren estudios adicionales con sPLA₂ hGIII pura en mayores cantidades para determinar si esta diferencia de velocidad es debida a una fracción aumentada de enzima unida a la interfase aniónica frente a con carga positiva y negativa, un valor menor de la K_M interfacial para fosfatidilglicerol frente a fosfatidilcolina, o ambos. Como se muestra en la Fig. 4A, la velocidad de hidrólisis de vesículas de fosfatidilmetanol por hGIII es completamente dependiente de Ca^{2+} con una K_d de $6 \pm 0,8 \mu M$. La K_d para Ca^{2+} de $6 \mu M$ para la acción de sPLA₂ hGIII sobre vesículas de fosfatidilmetanol es considerablemente más baja que los valores de submilimolar a milimolar indicados para otras sPLA₂s. Sin embargo, el valor de K_d medido en este estudio es un valor aparente. Para sPLA₂s, la unión de fosfolípido al lugar activo depende de Ca^{2+} , y así la K_d aparente observada para Ca^{2+} depende de la afinidad del lugar activo de la enzima por el sustrato de fosfolípido (36). La K_d para Ca^{2+} también es modulada por la afinidad de la enzima por la interfase de la vesícula porque la unión interfacial es un prerrequisito para la unión de fosfolípidos de cadena larga al lugar activo de la enzima. En este contexto, puede indicarse que la sPLA₂ grupo IIA humana se une a Ca^{2+} con afinidad milimolar en ausencia de sustrato (37, 38), pero la K_d por Ca^{2+} en presencia de fosfatidilglicerol (que soporta una unión interfacial y de lugar activo estrecha) en el intervalo micromolar bajo (39). Una vez que estén disponibles grandes cantidades de sPLA₂ hGIII recombinante, será posible usar métodos espectroscópicos para medir la afinidad de la enzima por Ca^{2+} en ausencia de sustrato. Como se muestra en la Fig. 4B, la sPLA₂ hGIII es activa óptimamente en vesículas de fosfatidilcolina a pH 8. El perfil pH-velocidad de hGIII es similar a muchas sPLA₂s (12). El aumento de la velocidad hasta pH 8 refleja probablemente de la histidina del lugar activo de modo que pueda funcionar como una base general para el ataque de una molécula de agua sobre el grupo carbonilo éster del sustrato (13).

II. 4 Comentarios finales

En los últimos años, el método de biología molecular ha revelado la presencia de una diversidad de sPLA₂s en mamíferos (5-9). La familia de sPLA₂s de mamíferos comprende ocho miembros de 14-17 kDa que incluyen sPLA₂s de un grupo I, 5 grupos II, un grupo V y un grupo X. Incluye también otoconina-95, una proteína principal del complejo otoconial extracelular del oído interno, que consiste en una proteína segregada grande de 469 residuos que contiene dos dominios tipo sPLA₂ (40, 41). Todas estas sPLA₂s tienen estructuras primarias conservadas, tienen en común diversos disulfuro y varias tienen una organización genómica similar. Estas sPLA₂s son así enzimas relacionadas estructuralmente que entran dentro del mismo grupo de proteínas, a saber el conjunto de sPLA₂ I/II/V/X. Debe indicarse no obstante que todas tienen distribución en tejidos y función distintas. La familia de sPLA de mamíferos comprende ahora también la sPLA₂ grupo III humana, que no pertenece al conjunto de sPLA₂ I/II/V/X. La sPLA₂ hGIII tiene una secuencia primaria de sPLA₂ distinta de las anteriores sPLA₂s, contiene regiones N- y C-terminales extra y tiene una organización genómica diferente. Juntas, esto indica que pueden expresar mamíferos sPLA₂s del conjunto de grupos I/II/V/X y del conjunto de grupo III distinto. De modo interesante, puede observarse lo mismo en reptiles, porque las sPLA₂s encontradas en venenos de serpientes son enzimas de los grupos I o II, mientras que las encontradas en venenos de lagartos pertenecen al grupo III (15). Además, como se ha señalado anteriormente (15), es probable que una especie de serpiente simple pueda expresar varias sPLA₂s de diferentes grupos que están presentes en diversos tejidos distintos de la glándula del veneno. Finalmente, aunque muchas sPLA₂s de las que se ha informado hasta ahora en el veneno de invertebrados parecen ser enzimas del grupo III (20, 22-25), la exploración de bases de datos nucleicas indica que los invertebrados también expresan sPLA₂s del conjunto de grupos I/II/V/X en otros tejidos. En resumen, esto hace probable que vertebrados e invertebrados expresen una variedad de sPLA₂s del conjunto de grupos I/II/V/X y del grupo III, y que estén presentes estas sPLA₂s en diversos tejidos para merecer funciones específicas. En último lugar, en base a las sPLA₂s actuales encontradas en mamíferos, es tentador especular que los vertebrados han “escogido” generar una diversidad de sPLA₂s del conjunto de grupos I/II/V/X y no del conjunto del grupo III. Queda sin embargo por determinar si más de una sPLA₂ grupo III se expresa en mamíferos, y si reptiles e invertebrados han hecho la misma “elección” para producir su propia diversidad de sPLA₂s.

En conclusión, se clonó una nueva sPLA₂ humana que pertenece claramente al grupo III. Esta sPLA₂ parece tener un cierto número de características estructurales distintas en comparación con las sPLA₂s grupo III de veneno conocidas, sugiriendo que la sPLA₂ hGIII puede no ser “equivalente” estructural de estas sPLA₂s de veneno (4). Su distribución en tejidos parece no redundante con otras sPLA₂s humanas, sugiriendo función(es) particular(es). El examen inicial de los inventores indica una expresión fuerte de sPLA₂ hGIII en corazón, riñón, hígado y músculo esquelético, pero, una análisis más extenso en una amplia variedad de tejidos, tipos de células y fluidos extracelulares en condiciones normales y patológicas podría subrayar funciones de sPLA₂ inesperadas. Hasta ahora, se han encontrado sPLA₂s en muchos tejidos y células, y sus funciones se han descubierto sólo lentamente. Algunas de ellas se han implicado como mediadores potenciales de inflamación, y sus niveles son elevados en numerosas enfermedades inflamatorias y tras provocar mediante citoquinas y endotoxinas proinflamatorias (3, 4, 9, 42). Los niveles de sPLA₂s también están aumentados en cáncer y se ha propuesto que las sPLA₂s juegan un papel en proliferación celular y cáncer (3, 4, 9). Las sPLA₂s también están aumentadas después de isquemia (3, 43) y pueden jugar un papel en neurotransmisión (44). Finalmente, las sPLA₂s se han implicado en mecanismos de defensa de hospedantes frente a diferentes cepas bacterianas (45-48) y, más recientemente, las sPLA₂s que incluyen grupo III de veneno de abeja se han revelado potentes inhibidores del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (49).

Referencias

1. Dennis, E. A. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 13057-13060
- 5 2. Dennis, E. A. (1997) *Trends Biol. Sci.* 22, 1-2
3. Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G., Inoue, K., and Kudo, I. (1997) *Crit. Rev. Immunol.* 17, 225-283
4. Lambeau, G., and Lazdunski, M. (1999) *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 162-170
- 10 5. Tischfield, J. A. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 17247-17250
6. Cupillard, L., Koumanov, K., Mattei, M. G., Lazdunski, M., and Lambeau, G. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 15745-15752
- 15 7. Valentin, E., Koduri, R. S., Scimeca, J.-C., Carie, G., Gelb, M. H., Lazdunski, M., and Lambeau, G. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 19152-19160
8. Valentin, E., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Lazdunski, M., and Lambeau, G. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 31195-31202
- 20 9. Ishizaki, J., Suzuki, N., Higashino, K., Yokota, Y., Ono, T., Kawamoto, K., Fujii, N., Arita, H., and Hanasaki, K. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 24973-24979
- 25 10. Wery, J. P., Schevitz, R. W., Clawson, D. K., Bobbitt, E. R., Dow, E. R., Gamboa, G., Goodson, T., Hermann, J., R. B., Kramer, R. M., McClure, D. B., Michelich, E. D., Putnam, J. E., Sharp, J. D., Stark, D. H., Teater, C., Warrick, M. W., and Jones, N. D. (1991) *Nature* 352, 79-82
11. Scott, D. L., Otwinowski, Z., Gelb, M. H., and Sigler, P. B. (1990) *Science* 250, 1563-1566
- 30 12. Gelb, M. H., Jain, M. K., Hanel, A. M., and Berg, O. G. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* 64, 653-688
13. Scott, D. L., White, S. P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M. H., and Sigler, P. B. (1990) *Science* 250, 1541-1546
- 35 14. Kini, R. M., and Evans, H. J. (1989) *Toxicon* 27, 613-635
15. Davidson, F. F., and Dennis, E. A. (1990) *J. Mol. Evol.* 31, 228-238
- 40 16. Kundu, G. C., and Mukherjee, A. B. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 2346-2353
17. Rufini, S., Cesaroni, M. P., Balestro, N., and Luly, P. (1996) *Biochem. J.* 320, 467-472
18. Ohara, O., Ishizaki, J., and Arita, H. (1995) *Prog. Lip. Res.* 34, 117-138
- 45 19. Cupillard, L., Mulherkar, R., Gomez, N., Kadam, S., Valentin, E., Lazdunski, M., and Lambeau, G. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 7043-7051
20. Kuchler, K., Gmachl, M., Sippl, M. J., and Kreil, G. (1989) *Eur. J. Biochem.* 184, 249-254
- 50 21. McIntosh, J. M., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Dooley, D. J., Stoehr, S. J., Giordani, A. B., Naisbitt, S. R., and Olivera, B. M. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 3518-3526
22. Zamudio, F. Z., Conde, R., Arevalo, C., Becerril, B., Martin, B. M., Valdivia, H. H., and Possani, L. D. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 11886-11894
- 55 23. Hoffman, D. R., and Jacobson, R. S. (1996) *J. Allergy Clin. Immunol.* 97, 812-821
24. Conde, R., Zamudio, F. Z., Becerril, B., and Possani, L. D. (1999) *FEBS Lett.* 460, 447-450
- 60 25. Lotan, A., Fishman, L., Loya, Y., and Zlotkin, E. (1995) *Nature* 375, 456
26. Sosa, B. P., Alagon, A. C., Martin, B. M., and Possani, L. D. (1986) *Biochemistry* 25, 2927-2933
- 65 27. Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C., Vigneron, L., Rathe, J., Stievenart, M., and Christophe, J. (1991) *Eur. J. Biochem.* 196, 537-544
28. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410

29. Guthrie, C. (1991) *Science* 253, 157-163

30. Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997) *Protein Eng.* 10, 1-6

31. Dunham, I., Shimizu, N., Roe, B. A., Chisoe, S., Hunt, A. R., Collins, J. E., Bruskiewich, R., Beare, D. M., Clamp, M., Smink, L. J., Ainscough, R., Almeida, J. P., Babbage, A., Bagguley, C., Bailey, J., Barlow, K., Bates, K. N., Beasley, O., Bird, C. P., Blakey, S., Bridgeman, A. M., Buck, D., Burgess, J., Burrill, W. D., and O'Brien, K. P. (1999) *Nature* 402, 489-495

32. Halban, P. A., and Imminger, J.-C. (1994) *Biochem. J.* 299, 1-18

33. Dudler, T., Chen, W. Q., Wang, S., Schneider, T., Annand, R. R., Dempcy, R. O., Cramer, R., Gmachl, M., Suter, M., and Gelb, M. H. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1165, 201-210

34. Han, S. K., Kim, K. P., Koduri, R., Bittova, L., Munoz, N. M., Leff, A. R., Wilton, D. C., Gelb, M. H., and Cho, W. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 11881-11888

35. Baker, S. F., Othman, R., and Wilton, D. C. (1998) *Biochemistry* 37, 13203-13211

36. Yu, B. Z., Berg, O. G., and Jain, M. K. (1993) *Biochemistry* 32, 6485-6492

37. Franken, P. A., Van den Berg, L., Huang, J., Gunyuzlu, P., Lugtigheid, R. B., Verheij, H. M., and De Haas, G. H. (1992) *Eur. J. Biochem.* 203, 89-98

38. Bayburt, T., Yu, B. Z., Lin, H. K., Browning, J., Jain, M. K., and Gelb, M. H. (1993) *Biochemistry* 32, 573-582

39. Marshall, L. A., and McCarte-Roshak, A. (1992) *Biochem. Pharmacol.* 44, 1849-1858

40. Wang, Y., Kowalski, P. E., Thalmann, I., Omitz, D. M., Mager, D. L., and Thalmann, R. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 15345-15350

41. Verpy, E., Leibovici, M., and Petit, C. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 529-534

42. Pruzanski, W., and Vadas, P. (1991) *Immunol. Today* 12, 143-146

43. Lauritzen, I., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1994) *Brain Res.* 651, 353-356

44. Kolko, M., DeCoster, M. A., de Turco, E. B., and Bazan, N. G. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 32722-32728

45. Harwig, S. S., Tan, L., Qu, X. D., Cho, Y., Eisenhauer, P. B., and Lehrer, R. I. (1995) *J. Clin. Invest.* 95, 603-610

46. Murakami, M., Tada, K., Nakajima, K., and Kudo, I. (1997) *J Immunol* 159, 439-46

47. Qu, X. D., and Lehrer, R. I. (1998) *Infect. Immun.* 66, 2791-2797

48. Dominiecki, M. E., and Weiss, J. (1999) *Infect. Immun.* 67, 2299-2305

49. Fenard, D., Lambeau, G., Valentin, E., Lefebvre, J. C., Lazdunski, M., and Doglio, A. (1999) *J. Clin. Invest.* 104, 611-618.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una sPLA₂ grupo III segregada por mamíferos constituida por, o que comprende, la secuencia de aminoácidos de la lista de secuencias con el número SEQ ID No. 2.
2. Una sPLA₂ grupo III segregada por mamíferos según la reivindicación 1ª, en la que dicho mamífero es un ser humano.
- 10 3. Una molécula de ácido nucleico constituida por una secuencia nucleica que codifica una sPLA₂ grupo III segregada por mamíferos, cuya secuencia de aminoácidos está representada en la lista de secuencias del apéndice con el número SEQ ID No. 2.
- 15 4. Una molécula de ácido nucleico constituida por, o que comprende, la secuencia de la lista de secuencias del apéndice con el número SEQ ID No. 1.
5. Un anticuerpo policlonal o monoclonal dirigido contra una sPLA₂ grupo III segregada por mamíferos según alguna de las reivindicaciones 1ª a 3ª.
- 20 6. Un vector que comprende al menos una molécula de ácido nucleico según alguna de las reivindicaciones 3ª o 4ª, ventajosamente asociada con secuencias de control adaptadas.
7. Un hospedante celular transformado por una molécula de ácido nucleico según alguna de las reivindicaciones 3ª o 4ª.
- 25 8. Un hospedante celular transformado por un vector según la reivindicación 6ª.
9. Un método *in vitro* para identificar un compuesto activo biológicamente capaz de inhibir la actividad catalítica de sPLA₂ según alguna de las reivindicaciones 1ª o 2ª, en el que el compuesto se añade a los hospedantes celulares según las reivindicaciones 7ª u 8ª, y se mide la liberación de ácidos grasos y lisofosfolípidos.
- 30 10. Un método *in vitro* para identificar un compuesto activo biológicamente por sus propiedades de unión a receptores de sPLA₂ que se unen a sPLA₂s grupo III según alguna de las reivindicaciones 1ª o 2ª, en el que se usa una sPLA₂ grupo III según alguna de las reivindicaciones 1ª o 2ª en ensayos de unión de competencia con dicho compuesto.
- 35 11. Un método *in vitro* para identificar un compuesto activo biológicamente que modula proliferación celular, migración de células, contracción de células o apoptosis, en el que se añade una sPLA₂ grupo III según alguna de las reivindicaciones 1ª o 2ª a células en presencia o ausencia de dicho compuesto y se ensaya en las células proliferación celular, migración de células, contracción de células o apoptosis.
- 40 12. Una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz terapéuticamente de una sPLA₂ grupo III segregada por mamíferos según alguna de las reivindicaciones 1ª o 2ª o de una molécula de ácido nucleico según alguna de las reivindicaciones 3ª o 4ª.

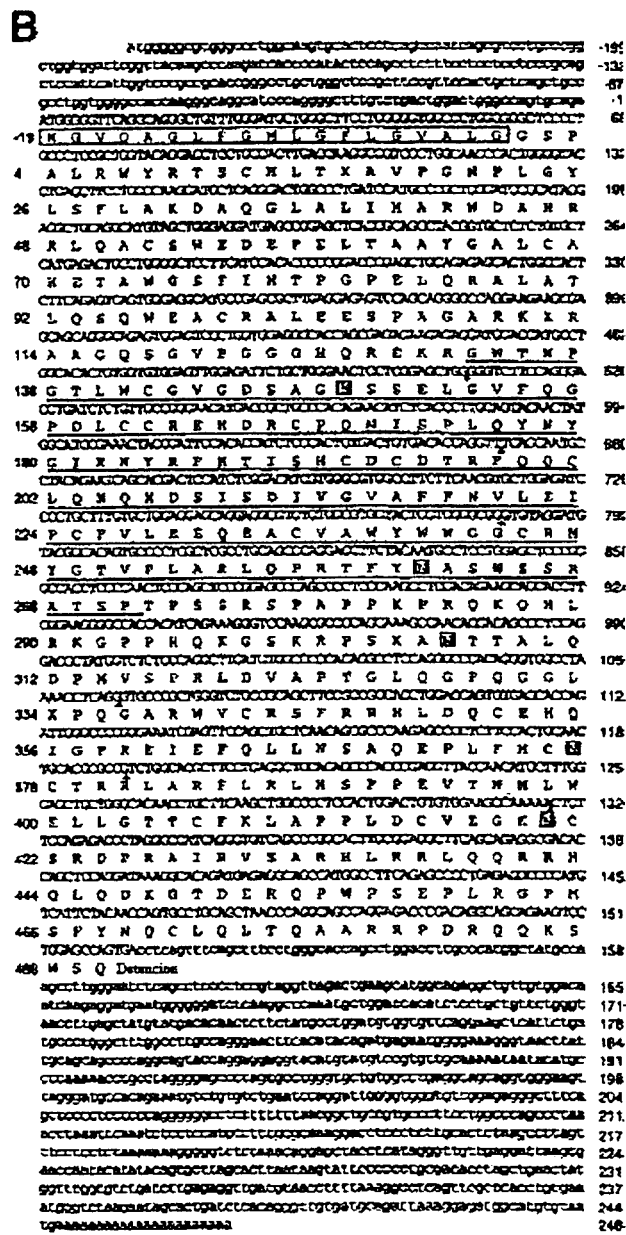
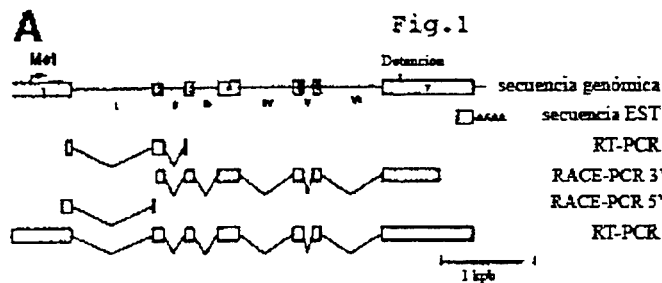




Fig.3

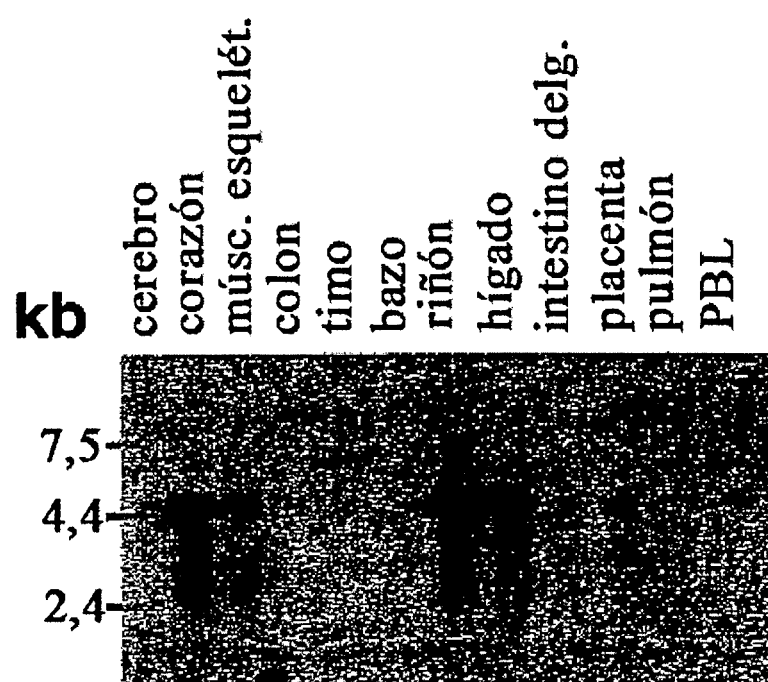
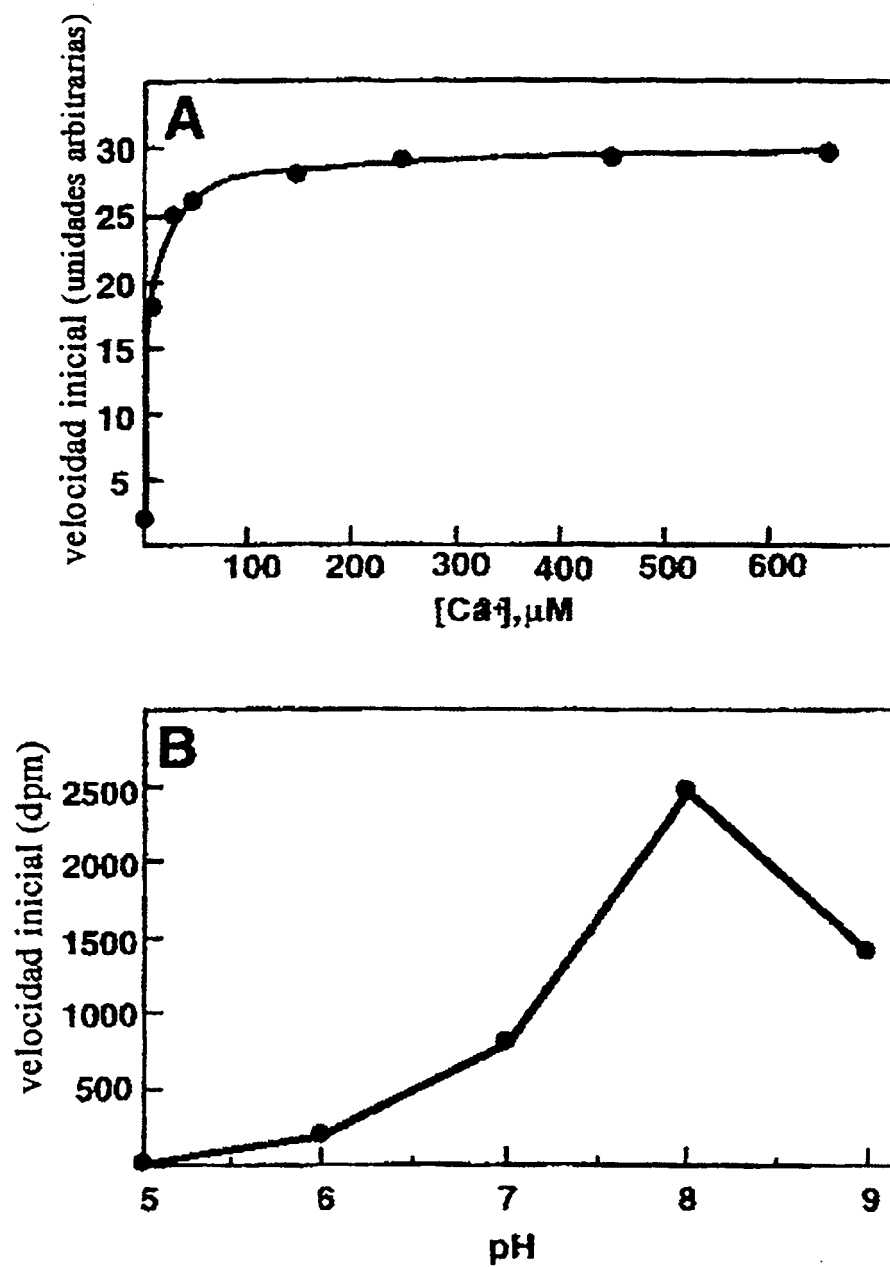


Fig.4



ES 2 295 134 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<100> Centre National de la Recherche Scientifique

5 <120> Nueva Fosfolipasa A2 grupo III segregada por mamíferos

<130> 7317prov\PCT

<140> XXX

10 <141> 09-02-2001

<150> Provisional de los EE.UU. 60/181.765

15 <151> 11-02-2000

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.0

20 <210> 1

<211> 2719

<212> ADN

25 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (254)..(1783)

30 <223> Gen que codifica fosfolipasa A2 grupo III segregada por seres humanos

<400> 1

```

35      atggggggcgt gggccctggc aagtgcactc ctcagccaat cagcgctctg cccggctggt      60
      ggattcgggtt acaagcccaa gatcacccca tactccagcc tctttcctcc tccctccgca      120
      gctccattca ttggctcccg cgcaccgggc ctgctgggct ccgcttccgt tccaetgctc      180
40      agctgcgcgc tgggtggggc accaagggca ggcattccag gggctttgtc tgactggact      240
      gggccagtgc aga atg ggg gtt cag gca ggg ctg ttt ggg atg ctg ggc      289
45      Met Gly Val Gln Ala Gly Leu Phe Gly Met Leu Gly
      1          5          10

      ttc ctg ggg gtc gcc ctg ggg ggc tcc cct gcc ctg cgc tgg tac agg      337
      Phe Leu Gly Val Ala Leu Gly Gly Ser Pro Ala Leu Arg Trp Tyr Arg
      15          20          25

50      acc tcc tgc cac ttg acc aag gcc gtc cct ggc aac cca ctg ggg tac      385
      Thr Ser Cys His Leu Thr Lys Ala Val Pro Gly Asn Pro Leu Gly Tyr
      30          35          40

55      ctg agc ttc ctg gcc aag gat gct cag gga ctg gcc ctg atc cat gcc      433
      Leu Ser Phe Leu Ala Lys Asp Ala Gln Gly Leu Ala Leu Ile His Ala
      45          50          55          60

60      cgc tgg gat gtc cat agg agg ctg cag gca tgt agc tgg gag gat gag      481

```

65

ES 2 295 134 T3

	Arg	Trp	Asp	Ala	His	Arg	Arg	Leu	Gln	Ala	Cys	Ser	Trp	Glu	Asp	Glu	
					65					70					75		
5	ccg	gag	ctc	acc	gca	gcc	tac	ggg	gct	ctc	tgt	gct	cat	gag	act	gcc	529
	Pro	Glu	Leu	Thr	Ala	Ala	Tyr	Gly	Ala	Leu	Cys	Ala	His	Glu	Thr	Ala	
				80				85						90			
10	tgg	ggc	tcc	ttc	atc	cac	acc	ccc	gga	ccc	gag	ctg	cag	aga	gca	ctg	577
	Trp	Gly	Ser	Phe	Ile	His	Thr	Pro	Gly	Pro	Glu	Leu	Gln	Arg	Ala	Leu	
			95					100					105				
15	gcc	act	ctt	cag	agt	cag	tgg	gag	gca	tgc	cga	gcg	ctt	gag	gag	agt	625
	Ala	Thr	Leu	Gln	Ser	Gln	Trp	Glu	Ala	Cys	Arg	Ala	Leu	Glu	Glu	Ser	
			110				115					120					
20	cca	gca	ggg	gcc	agg	aag	aag	cga	gca	gca	ggg	cag	agt	gga	gtc	cct	673
	Pro	Ala	Gly	Ala	Arg	Lys	Lys	Arg	Ala	Ala	Gly	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	
						130					135					140	
25	ggg	gga	ggg	cac	cag	cga	gag	aag	aga	gga	tgg	acc	atg	cct	ggc	aca	721
	Gly	Gly	Gly	His	Gln	Arg	Glu	Lys	Arg	Gly	Trp	Thr	Met	Pro	Gly	Thr	
					145					150					155		
30	ctg	tgg	tgt	gga	gtt	gga	gat	tct	gct	ggg	aac	tcc	tcg	gag	ctg	ggg	769
	Leu	Trp	Cys	Gly	Val	Gly	Asp	Ser	Ala	Gly	Asn	Ser	Ser	Glu	Leu	Gly	
				160				165						170			
35	gtc	ttc	cag	gga	cct	gat	ctc	tgt	tgc	cgg	gaa	cat	gac	cgc	tgc	cca	817
	Val	Phe	Gln	Gly	Pro	Asp	Leu	Cys	Cys	Arg	Glu	His	Asp	Arg	Cys	Pro	
				175				180					185				
40	cag	aac	atc	tca	ccc	ttg	cag	tac	aac	tat	ggc	atc	cga	aac	tac	cga	865
	Gln	Asn	Ile	Ser	Pro	Leu	Gln	Tyr	Asn	Tyr	Gly	Ile	Arg	Asn	Tyr	Arg	
				190			195				200						
45	ttc	cac	acc	atc	tcc	cac	tgt	gac	tgt	gac	acc	agg	ttt	cag	caa	tgc	913
	Phe	His	Thr	Ile	Ser	His	Cys	Asp	Cys	Asp	Thr	Arg	Phe	Gln	Gln	Cys	
						210					215				220		
50	cta	cag	aat	cag	cac	gac	tcc	atc	tcg	gac	atc	gtg	ggc	gtg	gcc	ttc	961
	Leu	Gln	Asn	Gln	His	Asp	Ser	Ile	Ser	Asp	Ile	Val	Gly	Val	Ala	Phe	
					225					230					235		
55	ttc	aac	gtg	ctg	gag	atc	ccc	tgc	ttt	gtg	ctg	gag	gag	cag	gag	gcg	1009
	Phe	Asn	Val	Leu	Glu	Ile	Pro	Cys	Phe	Val	Leu	Glu	Glu	Gln	Glu	Ala	
				240				245						250			
60	tgt	gtg	gcg	tgg	tac	tgg	tgg	ggc	ggg	tgt	agg	atg	tac	ggc	aca	gtg	1057
	Cys	Val	Ala	Trp	Tyr	Trp	Trp	Gly	Gly	Cys	Arg	Met	Tyr	Gly	Thr	Val	
				255				260					265				

ES 2 295 134 T3

	ccc ctc gct cgc ctg cag ccc agg acc ttc tac aat gcc tcc tgg agc	1105
	Pro Leu Ala Arg Leu Gln Pro Arg Thr Phe Tyr Asn Ala Ser Trp Ser	
	270 275 280	
5	ccc cgg gcc acc tcc cca act ccc agc tcc cgg agc cca gcc cct ccc	1153
	Ser Arg Ala Thr Ser Pro Thr Pro Ser Ser Arg Ser Pro Ala Pro Pro	
	285 290 295 300	
10	aag cct cga cag aag cag cac ctt cgg aag ggg cca cca cat cag aaa	1201
	Lys Pro Arg Gln Lys Gln His Leu Arg Lys Gly Pro Pro His Gln Lys	
	305 310 315	
15	ggg tcc aag cgc ccc agc aaa gcc aac acc aca gcc ctc cag gac cct	1249
	Gly Ser Lys Arg Pro Ser Lys Ala Asn Thr Thr Ala Leu Gln Asp Pro	
	320 325 330	
20	atg gtc tct ccc agg ctt gat gtg gcc ccc aca ggc ctc cag ggc cca	1297
	Met Val Ser Pro Arg Leu Asp Val Ala Pro Thr Gly Leu Gln Gly Pro	
	335 340 345	
	cag ggt ggc cta aaa cct cag ggt gcc cgc tgg gtc tgc cgc agc ttc	1345
	Gln Gly Gly Leu Lys Pro Gln Gly Ala Arg Trp Val Cys Arg Ser Phe	
	350 355 360	
25	cgc cgc cac ctg gac cag tgt gag cac cag att ggg ccc cgg gaa atc	1393
	Arg Arg His Leu Asp Gln Cys Glu His Gln Ile Gly Pro Arg Glu Ile	
	365 370 375 380	
30	gag ttc cag ctg ctc aac agc gcc caa gag ccc ctc ttc cac tgc aac	1441
	Glu Phe Gln Leu Leu Asn Ser Ala Gln Glu Pro Leu Phe His Cys Asn	
	385 390 395	
35	tgc acg cgc cgt ctg gca cgc ttc ctg agg ctc cac agc cca ccc gag	1489
	Cys Thr Arg Arg Leu Ala Arg Phe Leu Arg Leu His Ser Pro Pro Glu	
	400 405 410	
	gtt acc aac atg ctt tgg gag ctg ctg ggc aca acc tgc ttc aag ctg	1537
	Val Thr Asn Met Leu Trp Glu Leu Leu Gly Thr Thr Cys Phe Lys Leu	
	415 420 425	
40	gcc cct cca ctg gac tgt gtg gaa ggc aaa aac tgt tcc aga gac cct	1585
	Ala Pro Pro Leu Asp Cys Val Glu Gly Lys Asn Cys Ser Arg Asp Pro	
	430 435 440	
45	agg gcc atc agg gtg tca gcc cgg cac ttg cgg agg ctt cag cag agg	1633
	Arg Ala Ile Arg Val Ser Ala Arg His Leu Arg Arg Leu Gln Gln Arg	
	445 450 455 460	
50	cga cac cag ctc cag gat aaa ggc aca gat gag agg cag cca tgg cct	1681
	Arg His Gln Leu Gln Asp Lys Gly Thr Asp Glu Arg Gln Pro Trp Pro	
	465 470 475	

ES 2 295 134 T3

```

tca gag ccc ctg aga ggc ccc atg tca ttc tac aac cag tgc ctg cag 1729
Ser Glu Pro Leu Arg Gly Pro Met Ser Phe Tyr Asn Gln Cys Leu Gln
      480                485                490

5   cta acc cag gca gcc agg aga ccc gac agg cag cag aag tcc tgg agc 1777
    Leu Thr Gln Ala Ala Arg Arg Pro Asp Arg Gln Gln Lys Ser Trp Ser
      495                500                505

10  cag tga cctcagtttc agctttcctg ggcaccagcc tggaccttgc ccatggctat 1833
    Gln

    gccaaagcctt gggaaatctca gctccccctc cgtagggttag actgaagcat ggcagaggct 1893

15  gttgtggaca atcaagagga tgaatggggg gatctcaagg cccaaatgct ggaccacatc 1953

    tctgtctgtt ctgggtatcc ttgagctatg tatgacacaa ctcttctatg cctggatgtg 2013

20  gctgttcagga agctcattct gatgccctgg gctttggcct tgccagggaa cttcacatc 2073

    agatgagaat ggggaagggg taacttattg cagcagcccc aggcagttacc aggaggaggt 2133

    acatgtatgt ccgtgttgca aaaataatac atgcctcaaa aacctgccta ggggagccct 2193

25  agtgccctggg tgctgtggcc tgaggtagca ggtgggaagt tagggatgtc acagaatgt 2253

    ctgtgtctga atccaggatt ggggtgggtg ttggagaggg ctctcagctc cctcctccc 2313

30  aggggggccc ctttttttaa cggctgccgt gcccttctct gccacagccc aaacctaat 2373

    tcaaatctcc tccatgcctt tgcgcaaaagg acctccctct tgcactctaa gccttagttt 2433

    cctcctctaa aaaaaggggg tctctaaaca ggagctacct catagggttg ttgaggatta 2493

35  agtgaaccaa tacatataca gtgcttagca ctttaataagt attccccctt gcgacacct 2553

    gctgaactat ggtttgggtg ctgatcttga gaggttgatg taacctttta aaggccctcag 2613

40  ttcgctcacc tgtgaaatgg gtctaagaat agcactgac tcacaggggt gtgatgcaga 2673

    ttaaaggaga tggcatgtgt aatgaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2719

```

```

45 <210> 2
    <211> 509
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

50 <400> 2

```

```

55 Met Gly Val Gln Ala Gly Leu Phe Gly Met Leu Gly Phe Leu Gly Val
    1          5          10          15

    Ala Leu Gly Gly Ser Pro Ala Leu Arg Trp Tyr Arg Thr Ser Cys His

```

60

65

ES 2 295 134 T3

	20	25	30
5	Leu Thr Lys Ala Val Pro Gly Asn Pro Leu Gly Tyr Leu Ser Phe Leu 35 40 45		
10	Ala Lys Asp Ala Gln Gly Leu Ala Leu Ile His Ala Arg Trp Asp Ala 50 55 60		
15	His Arg Arg Leu Gln Ala Cys Ser Trp Glu Asp Glu Pro Glu Leu Thr 65 70 75 80		
20	Ala Ala Tyr Gly Ala Leu Cys Ala His Glu Thr Ala Trp Gly Ser Phe 85 90 95		
25	Ile His Thr Pro Gly Pro Glu Leu Gln Arg Ala Leu Ala Thr Leu Gln 100 105 110		
30	Ser Gln Trp Glu Ala Cys Arg Ala Leu Glu Glu Ser Pro Ala Gly Ala 115 120 125		
35	Arg Lys Lys Arg Ala Ala Gly Gln Ser Gly Val Pro Gly Gly Gly His 130 135 140		
40	Gln Arg Glu Lys Arg Gly Trp Thr Met Pro Gly Thr Leu Trp Cys Gly 145 150 155 160		
45	Val Gly Asp Ser Ala Gly Asn Ser Ser Glu Leu Gly Val Phe Gln Gly 165 170 175		
50	Pro Asp Leu Cys Cys Arg Glu His Asp Arg Cys Pro Gln Asn Ile Ser 180 185 190		
55	Pro Leu Gln Tyr Asn Tyr Gly Ile Arg Asn Tyr Arg Phe His Thr Ile 195 200 205		
60	Ser His Cys Asp Cys Asp Thr Arg Phe Gln Gln Cys Leu Gln Asn Gln 210 215 220		
65			

ES 2 295 134 T3

	His	Asp	Ser	Ile	Ser	Asp	Ile	Val	Gly	Val	Ala	Phe	Phe	Asn	Val	Leu	
	225					230					235					240	
5	Glu	Ile	Pro	Cys	Phe	Val	Leu	Glu	Glu	Gln	Glu	Ala	Cys	Val	Ala	Trp	
					245					250					255		
10	Tyr	Trp	Trp	Gly	Gly	Cys	Arg	Met	Tyr	Gly	Thr	Val	Pro	Leu	Ala	Arg	
				260					265					270			
15	Leu	Gln	Pro	Arg	Thr	Phe	Tyr	Asn	Ala	Ser	Trp	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	
			275					280					285				
20	Ser	Pro	Thr	Pro	Ser	Ser	Arg	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Lys	Pro	Arg	Gln	
		290					295					300					
25	Lys	Gln	His	Leu	Arg	Lys	Gly	Pro	Pro	His	Gln	Lys	Gly	Ser	Lys	Arg	
	305					310					315					320	
30	Pro	Ser	Lys	Ala	Asn	Thr	Thr	Ala	Leu	Gln	Asp	Pro	Met	Val	Ser	Pro	
					325					330					335		
35	Arg	Leu	Asp	Val	Ala	Pro	Thr	Gly	Leu	Gln	Gly	Pro	Gln	Gly	Gly	Leu	
				340					345					350			
40	Lys	Pro	Gln	Gly	Ala	Arg	Trp	Val	Cys	Arg	Ser	Phe	Arg	Arg	His	Leu	
			355					360					365				
45	Asp	Gln	Cys	Glu	His	Gln	Ile	Gly	Pro	Arg	Glu	Ile	Glu	Phe	Gln	Leu	
		370					375					380					
50	Leu	Asn	Ser	Ala	Gln	Glu	Pro	Leu	Phe	His	Cys	Asn	Cys	Thr	Arg	Arg	
	385					390					395					400	
55	Leu	Ala	Arg	Phe	Leu	Arg	Leu	His	Ser	Pro	Pro	Glu	Val	Thr	Asn	Met	
					405					410					415		
60	Leu	Trp	Glu	Leu	Leu	Gly	Thr	Thr	Cys	Phe	Lys	Leu	Ala	Pro	Pro	Leu	
				420					425					430			

ES 2 295 134 T3

Asp Cys Val Glu Gly Lys Asn Cys Ser Arg Asp Pro Arg Ala Ile Arg
435 440 445

5 Val Ser Ala Arg His Leu Arg Arg Leu Gln Gln Arg Arg His Gln Leu
450 455 460

10 Gln Asp Lys Gly Thr Asp Glu Arg Gln Pro Trp Pro Ser Glu Pro Leu
465 470 475 480

15 Arg Gly Pro Met Ser Phe Tyr Asn Gln Cys Leu Gln Leu Thr Gln Ala
485 490 495

20 Ala Arg Arg Pro Asp Arg Gln Gln Lys Ser Trp Ser Gln
500 505

25

30

35

40

45

50

55

60

65