

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 336 752**

21 Número de solicitud: 200801860

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **20.06.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **15.04.2010**

Fecha de la concesión: **28.04.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **11.05.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
11.05.2011

73 Titular/es: **Hospital Clínic i Provincial de Barcelona
c/ Villarroel, 170
08036 Barcelona, ES
Universitat de Barcelona y
Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica**

72 Inventor/es: **Lozano Soto, Francisco y
Vera Fernández, Jorge**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas de CD5.**

57 Resumen:

Composiciones farmacéuticas de CD5.

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el ectodominio soluble de CD5 y a su empleo en la prevención y/o el tratamiento de infecciones fúngicas y/o septicemia fúngica, así como trastornos inflamatorios desencadenados por componentes fúngicos.

ES 2 336 752 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas de CD5.

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de las infecciones fúngicas. Se refiere específicamente a composiciones farmacéuticas que comprenden el ectodominio soluble de CD5 para la prevención y/o el tratamiento de infecciones fúngicas y/o septicemia fúngica, así como trastornos inflamatorios desencadenados por componentes fúngicos.

10

Antecedentes de la invención

El reconocimiento de patógenos por el sistema inmunitario innato se basa en un número limitado de receptores codificados por la línea germinal que han evolucionado hasta identificar estructuras microbianas conservadas, esenciales para su supervivencia y no compartidas por el huésped, los denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (1, 2). Ejemplos de PAMP son el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas, el ácido lipoteicoico (LTA) y el peptidoglicano (PGN) de bacterias Gram positivas, el lipoarabinomano de micobacterias, y los β -glucanos y mananos de hongos. Existen varias clases estructural y funcionalmente diversas de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que inducen diversas rutas de defensa del huésped. Los dominios de proteína implicados en el reconocimiento de patrones incluyen, entre otros, el dominio lectina de tipo C de las lectinas de células dendríticas (DC), las repeticiones ricas en leucina (LRR) de receptores tipo Toll (TLR) y el dominio rico en cisteínas tipo receptor *scavenger* (SRCR) (2). Este último se describió por primera vez tras la clonación del receptor *scavenger* clase A tipo I (SR-AI) de los macrófagos murinos (3). La comparación de secuencias con distintas proteínas, tales como el receptor *speract* de erizo de mar, el CD5 humano y murino y el factor I del complemento (CFI) reveló la existencia de un motivo conservado de 100 aminoácidos de tamaño, característico de una nueva superfamilia de receptores proteicos, denominada SRCR-SF. Esta familia está compuesta actualmente por más de 30 proteínas diferentes, secretadas y/o de membrana, con representantes en la mayoría de las especies animales, desde los invertebrados inferiores hasta los mamíferos (4). Los miembros de la SRCR-SF se dividen en dos grupos: los miembros del grupo A contienen dominios SRCR compuestos por 6 cisteínas y están codificados por dos exones, mientras que los del grupo B contienen 8 cisteínas y están codificados por un único exón. Datos estructurales recientes indican, sin embargo, que ambos dominios SRCR (A y B) comparten un armazón proteínico similar (un núcleo central formado por dos láminas β antiparalelas y una hélice α), observándose las diferencias principales en los bucles de conexión externos (5). Esta situación recuerda la de otros módulos proteicos del sistema inmunitario a partir de los que se ha establecido la evolución y se han construido miles de proteínas diferentes (por ejemplo, el dominio tipo inmunoglobulina). La versatilidad de estos dominios conservados radica en el hecho de que los residuos clave que estabilizan la estructura de dominio están conservados a lo largo de la evolución mientras que otros pueden evolucionar libremente (especialmente aquéllos en los bucles externos) dando lugar a una gran diversidad funcional (6). Por consiguiente, a pesar de su alto grado de conservación estructural y filogenética no hay una función unificadora descrita para los dominios SRCR. Algunos de ellos se han implicado en interacciones proteína-proteína siendo los ejemplos mejor estudiados de ello la interacción del receptor linfocitario CD6 con CD166/ALCAM, una molécula de adhesión transmembrana que pertenece a la superfamilia de las Ig (7, 8), y la del receptor de macrófagos de CD163/M130 con el complejo de hemoglobina-haptoglobina (9). También se sabe que algunos miembros de SRCR-SF de ambos grupos, A (es decir, SR-AI/II, MARCO y SCARA5) y B (es decir, DMBT1, Sp α y CD6), interactúan con los PAMP presentes en superficies de bacterias, tales como LPS, LTA y PGN. Aunque estas interacciones se mapearon inicialmente fuera del dominio SRCR (10), datos recientes demuestran la participación directa de los dominios SRCR en el mismo (11-14). Por tanto, sigue siendo necesario analizar si la detección de patógenos es una propiedad general compartida por todos los miembros de la SRCR-SF o sólo por un grupo seleccionado.

Los receptores transmembrana tipo I CD5 y CD6 son dos miembros linfoides del grupo B de la SRCR-SF. Ambos comparten similitudes importantes a nivel estructural y funcional y están codificados por genes contiguos en la misma región cromosómica que se cree que derivan de la duplicación de un gen ancestral común (15, 16). CD5 y CD6 se expresan en timocitos desde fases tempranas de su desarrollo, en células T periféricas maduras y en células B1a, una pequeña subpoblación de células B maduras responsable de la producción de anticuerpos naturales polirreactivos y que se expande en ciertas enfermedades autoinmunitarias y en leucemias linfocíticas crónicas de células B (17). Las regiones extracelulares de CD5 y CD6, están compuestas exclusivamente por tres dominios consecutivos SRCR del grupo B, que muestran una extensa identidad de secuencia aminoacídica (5). Las principales diferencias entre CD5 y CD6 se encuentran en sus regiones citoplasmáticas, las cuales carecen de actividad catalítica intrínseca pero contienen varios motivos estructurales compatibles con una función transductora de señales (18, 19). A ese respecto, CD5 y CD6 se asocian físicamente al receptor específico de antígeno presente en células T (TCR) y B (BCR) (20, 21) y se ubican junto con éste en el centro de la sinapsis inmunológica (21, 22). Por tanto, CD5 y CD6 están bien situados para modular positiva o negativamente las señales de activación y diferenciación generadas por el receptor específico de antígeno (22-26) a través de rutas de señalización complejas y todavía no completamente comprendidas (23, 27-29). Esto se consigue probablemente a través de la interacción de los ectodominios de CD5 y CD6 con diferentes contrareceptores de superficie celular. Aunque está bien establecido que CD6 se une a CD166/ALCAM (30), todavía falta un ligando de CD5 *bona fide* (31-35). De manera interesante, parece que CD5 y CD6 se diferencian en restos críticos para la unión a CD166/ALCAM (36).

65

En un estudio previo se exploraron las capacidades de unión a bacterias de los ectodominios de CD5 y CD6, los cuales se sabe que existen como formas solubles circulantes en suero (37, 38). Los datos obtenidos indican que ambas formas de CD6, solubles y de membrana, pero no de CD5, se unen a la superficie de bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas a través del reconocimiento de los PAMP específicos (en concreto, LPS y LTA, respectivamente) (39).

Otros estudios han demostrado que las células que expresan en su superficie el receptor CD5, ya sean células T o células B, poseen la capacidad de reconocer y, en mayor o menor medida, afectar al normal desarrollo de *C. neoformans* y *C. albicans* (48, 49).

Sin embargo, no se ha descrito ni sugerido el mecanismo por el cual este receptor reconoce o tiene afinidad por las células fúngicas.

Ahora, los autores de la presente invención han extendido estos estudios el análisis de las propiedades de reconocimiento y de unión de CD5 y CD6 a estructuras fúngicas y han comprobado que, en comparación con CD6, el ectodominio de CD5 es adecuado para el reconocimiento de componentes conservados de las superficies celulares fúngicas, demostrando por primera vez que dicha región extracelular aislada del receptor CD5 puede proporcionar profilaxis *in vivo* por sí misma frente a una infección por hongos en general y no sólo frente *C. neoformans* y *C. albicans*.

Así, han demostrado que formas solubles del ectodominio de CD5 se unen a y agregan específicamente células fúngicas. Esto se realiza a través del reconocimiento, por el ectodominio soluble de CD5, de β -glucanos, un componente estructural y altamente conservado de las paredes celulares fúngicas.

Además, de forma sorprendente, los autores de la presente invención han demostrado que los ectodominios de CD5 solubles tienen un efecto protector en el modelo de ratón de síndrome del shock séptico inducido por zimosán.

Estos resultados apoyan la utilidad terapéutica de la administración del ectodominio soluble de CD5 humano para el tratamiento del síndrome del shock séptico u otros procesos inflamatorios de origen fúngico.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. *Interacción del ectodominio de CD5 con células fúngicas completas.*

(A) Detección de la unión proteínas de CD5 y CD6 solubles recombinantes marcadas con biotina (rshCD5-b y rshCD6-b) a células fúngicas comensales (*S. pombe*) o patógenas (*C. albicans*, *C. neoformans*). (B) Unión dependiente de dosis y de Ca^{2+} de rshCD5 marcada con biotina a *C. albicans* (C) Detección de la unión de rshCD5 o rshCD6 marcadas con biotina a *E. coli* o *S. aureus* (D) Detección de la unión de los ectodominios individuales de CD5 (CD5.DI, CD5.DII o CD5.DIII) a *C. albicans* y *C. neoformans*.

Figura 2. *Inducción de agregación de células fúngicas mediante rshCD5.*

Suspensiones celulares de *C. albicans* marcadas con FITC incubadas con albúmina de suero bovino (BSA), rshCD5 o rshCD6, bien solas (panel superior e intermedio), o bien en presencia de cantidades en exceso de zimosán o β -glucano o manano (panel inferior).

Figura 3. *Unión directa de rshCD5 a zimosán pero no a constituyentes de la pared celular bacteriana.*

(A) Placas de ELISA revestidas con BSA, zimosán (ZYM), LPS, PGN o LTA incubadas con cantidades crecientes de rshCD5 marcada con biotina. (B) Placas de ELISA revestidas con BSA, zimosán (ZYM), lipopolisacárido (LPS), peptidoglicano (PGN) o ácido lipoteicoico (LTA) incubadas con cantidades crecientes rshCD6 marcada con biotina.

Figura 4. *Competición de la unión de rshCD5 a zimosán o a células fúngicas completas por β -glucanos.*

(A) Competición de la unión de rshCD5 y rshCD6 marcadas con biotina a placas de ELISA revestidas con zimosán en presencia de cantidades crecientes de β -D-glucano, zimosán, manano o BSA. (B) Competición de la unión de rshCD5 marcada con biotina a suspensiones celulares de *C. albicans* o *C. neoformans* en presencia de cantidades crecientes de zimosán, β -D-glucano, glucano, β -1,3-glucano o manano.

Figura 5. *Zimosán marcado con FITC se une a CD5 de membrana.*

(A) Cantidades crecientes de zimosán marcado con FITC incubado con células Jurkat 2G5 deficientes en CD5 y CD6 sin transfectar (histograma superior) o bien transfectadas (histograma inferior) para expresar el receptor CD5 de membrana de tipo silvestre (2G5-CD5.WT) (B) Transfectantes de Jurkat 2G5 que expresan el receptor CD5 de membrana de tipo silvestre (2G5-CD5.WT) teñidos con zimosán marcado con FITC en presencia de cantidades crecientes de zimosán (parte superior), β -D-glucano (parte intermedia) y manano (parte inferior).

ES 2 336 752 B1

Figura 6. Zimosán induce la activación de la cascada de MAPK y la liberación de citocinas mediadas por CD5.

(A) Células Jurkat 2G5 que expresan las formas silvestre (2G5-CD5.WT) o truncada en su cola citoplasmática (2G5-CD5-K384^{STOP}) de CD5, sometidas a pulsos de zimosán y analizadas mediante Western blot con antisuero policlonal de conejo anti-ERK1/2 fosforilada (pERK1/2), antisuero monoclonal de ratón anti-MEK fosforilada (pMEK) y antisuero policlonal de conejo anti-cdk4 como control de carga. (B) Liberación de IL-8 inducida por zimosán en células HEK 293 o células HEK 293-TLR2 que expresan de manera transitoria formas de membrana de CD5 silvestre (CD5.WT) o truncada en su cola citoplasmática (CD5.K384^{STOP}). (C) Análisis por Western blot de la expresión de CD5 en muestras de células del experimento mostrado en (B).

Figura 7. El pretratamiento con rshCD5 protege frente al síndrome del shock séptico inducido por zimosán en ratones.

(A) Escala de toxicidad de ratones CD1 distribuidos en los grupos: BSA, ratones tratados con BSA (25 μ g; i.p.) sola; BSA + ZYM, ratones pretratados con BSA (25 μ g; i.p.) 1 h antes de tratarse con zimosán (500 mg/kg; i.p.); rshCD5 + ZYM, ratones pretratados con rshCD5 (25 μ g; i.p.) 1 h antes de tratarse con zimosán (500 mg/kg; i.p.). (B) Recuento total de leucocitos en exudado peritoneal a las 18 h de la administración de zimosán a los mismos grupos de animales que en A. N=20 para cada grupo. (C) Niveles en suero de IL-6 (izquierda) e IL-1 β (derecha) a las 18 h de la administración de zimosán a los mismos grupos de animales que en A. N=15 para cada grupo. (D) Actividad mieloperoxidasa (MPO) en hígado (mU/mg de tejido húmedo) a las 18 h de la administración de zimosán a los mismos grupos de animales que en A. N=3 para cada grupo. (E) Curvas de supervivencia de ratones de los mismos grupos que en A. N=25 por grupo.

Objeto de la invención

Un objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende el ectodominio soluble del receptor linfocitario CD5 y al menos un excipiente farmacéutico.

También es objeto de la invención el uso del ectodominio soluble de CD5 para el reconocimiento de y/o la unión a β -glucanos fúngicos.

Otro objeto de la invención es el uso del ectodominio soluble de CD5 para agregar células fúngicas y/o componentes de la pared celular fúngica rica en β -glucanos.

Finalmente, también es objeto de la invención el uso del ectodominio soluble de CD5 para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una infección fúngica y/o septicemia fúngica y/o cualquier trastorno inflamatorio desencadenado por componentes fúngicos.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han demostrado que el ectodominio soluble de CD5 se une a y agrega células fúngicas a través del reconocimiento de componentes conservados de las superficies celulares fúngicas, en concreto β -glucanos.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende formas solubles del ectodominio completo de CD5 o bien partes del mismo, y al menos un excipiente farmacéutico, tal como glicerol, sacarosa, etc.

Un *ectodominio* es la parte de una proteína de membrana que se extiende hacia el espacio extracelular (el espacio fuera de una célula). La región extracelular de CD5 está compuesta por tres dominios consecutivos SRCR (CD5.D1, CD5.DII y CD5.DIII). Los tres ectodominios SRCR individuales de CD5 conservan la capacidad para interactuar con las superficies celulares fúngicas. Por tanto, en el contexto de la presente invención, se considera que el *ectodominio soluble de CD5* es cualquiera de los dominios CD5.DI, CD5.DII y CD5.DIII o combinaciones que incluyan cualquiera de ellos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse mediante infusión o inyección por vía sistémica, preferentemente intravenosa o intraperitoneal. En una realización preferida, la composición farmacéutica de ectodominio soluble de CD5 está en forma inyectable.

La administración de ectodominio de CD5 soluble es beneficiosa para la prevención y/o el tratamiento de una infección fúngica y/o septicemia de origen fúngico. Además, el ectodominio de CD5 soluble también es útil para la prevención y/o el tratamiento de procesos inflamatorios provocados por componentes fúngicos, incluso si no tiene lugar una infección clínica activa (o septicemia). Los componentes de la pared fúngica provocan reacciones inflamatorias, independientemente de si avanza hasta una infección clínica o no, y, en esos casos, el ectodominio soluble de CD5 también es eficaz porque actúa previniendo sus efectos inflamatorios.

ES 2 336 752 B1

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica de ectodominio de CD5 soluble para la prevención y/o el tratamiento de una infección fúngica y/o septicemia y/o cualquier trastorno inflamatorio desencadenado por componentes fúngicos, tal como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS); serositis asépticas, etc.

5

La infección y/o septicemia y/o el trastorno inflamatorio se produce por especies de hongos saprofitas y no saprofitas. En una realización particular, las especies de hongos son *Candida albicans* o *Cryptococcus neoformans*.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del ectodominio soluble de CD5 para el reconocimiento de y/o la unión a β -glucanos.

10

La unión del ectodominio de CD5 soluble es saturable y dosis-dependiente, y se ve favorecido enormemente por Ca^{2+} .

15

Otro aspecto se refiere al uso del ectodominio soluble de CD5 para agregar células fúngicas y/o componentes de la pared celular fúngica ricos en β -glucanos de varias especies de hongos (saprofitas o bien patógenas).

El hecho de que el ectodominio de CD5 soluble no sólo se una a células fúngicas sino que también las agregue es importante, ya que la agregación es una estrategia común usada por los componentes del sistema inmunitario innato para dificultar la diseminación de patógenos y facilitar la aclaración de patógenos mediante los fagocitos.

20

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del ectodominio soluble de CD5 para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una infección fúngica y/o septicemia y/o cualquier trastorno inflamatorio desencadenado por componentes fúngicos.

25

La infección y/o septicemia y/o el trastorno inflamatorio se produce por especies de células fúngicas saprofitas y no saprofitas. En una realización particular, estas especies de hongos son *Candida albicans* o *Cryptococcus neoformans*.

La generación de ectodominios DIII solubles recombinantes humanos de CD5 (rshCD5.DIII), ya ha sido descrita previamente (5).

30

Ahora, en la presente invención, los autores de la presente invención han desarrollado nuevos cebadores para la generación de constructos de expresión para los ectodominios solubles humanos recombinantes DI y DII de CD5 (rshCD5.DI y rshCD5.DII). Los dos oligonucleótidos empleados en la amplificación del ectodominio DI de rshCD5 presentan la SEQ ID NO 1 y la SEQ ID NO 2, respectivamente, y los dos oligonucleótidos para la amplificación de DII de rshCD5 presentan la SEQ ID NO 3 y la SEQ ID NO 4, respectivamente.

35

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para obtener un ectodominio DI soluble humano recombinante de CD5 (rshCD5.DI) que comprende:

40

- a) la amplificación del ectodominio DI por PCR usando los cebadores de secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2,
- b) la clonación del fragmento amplificado en un vector de expresión, y
- c) la expresión y purificación del ectodominio soluble humano recombinante DI de CD5.

45

En una realización preferida, se clona el fragmento amplificado en un vector pCEP-Pu (Kohfeldt *et al*, 1997) digerido de manera apropiada.

50

En otra realización preferida, la expresión del ectodominio DI de CD5 soluble humano recombinante se lleva a cabo en células HEK 293-EBNA.

Finalmente, otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para obtener un ectodominio DII de CD5 soluble recombinante que comprende:

55

- a) la amplificación del ectodominio DII por PCR, usando los cebadores de secuencias SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4,
- b) la clonación del fragmento amplificado en un vector de expresión, y
- c) la expresión y purificación del ectodominio DII de CD5 recombinante.

60

En una realización preferida, se clona el fragmento amplificado en un vector pCEP-Pu digerido de manera apropiada.

65

En otra realización preferida, la expresión del ectodominio DII de CD5 soluble humano recombinante se lleva a cabo en células HEK 293-EBNA.

Los ejemplos que siguen a continuación ilustran la presente invención, pero no deben ser considerados como limitación a los aspectos esenciales del objeto de la misma, tal como han sido expuestos en los apartados anteriores de esta descripción.

5 Ejemplos

Ejemplo 1

Los ectodominios de SRCR de CD5 humano se unen a suspensiones de células fúngicas completas

10 En un esfuerzo para ampliar los estudios sobre las propiedades de unión microbiana de los ectodominios de los receptores de linfocitos CD5 y CD6 humanos (39), los autores de la presente invención realizaron ensayos de unión directa a proteínas en hongos. Para esto, se incubó una cantidad fija (15 μg) de preparaciones marcadas con biotina de proteínas solubles recombinantes purificadas por afinidad que abarcaban los tres ectodominios de SRCR de CD5 humano (rshCD5) o de CD6 humano (rshCD6) con 10^8 células de *S. pombe*, *C. albicans* o *C. neoformans* durante la noche a 4°C. Se ha demostrado previamente que estas proteínas rshCD5 y rshCD6 son indistinguibles (en propiedades de peso molecular aparente, reactividad frente a anticuerpos y unión celular) con respecto a las formas circulantes equivalentes presentes en el suero humano normal (33, 39). Tras un lavado exhaustivo, se solubilizó la unión a proteínas con tampón de muestra de Laemmli y se hizo pasar sobre geles de SDS/PAGE para su posterior análisis por Western blot mediante estreptavidina marcada con peroxidasa del rábano (HRP-SAv) y revelado por quimioluminiscencia. Los resultados mostraron que rshCD5 se une a las especies de células de hongos saprofitas (*S. pombe*) y las patógenas (*C. albicans*, *C. neoformans*) sometidas a prueba, mientras que rshCD6 se une sólo a la saprofita (Fig. 1A). Se analizó la unión de cantidades crecientes (desde 1 μg hasta 20 μg) de rshCD5 marcada con biotina a *C. albicans* tal como en la figura 1A. También se muestra la unión de 20 μg de rshCD5 marcada con biotina en presencia de EDTA 5 mM. Se demostró que la unión de rshCD5 era dependiente de la dosis y saturable, y se facilitaba enormemente por Ca^{2+} ya que se observó una unión reducida tras la adición de EDTA (Fig. 1B). Cuando se sometieron a prueba las mismas preparaciones de proteína para determinar la unión a 10^8 bacterias Gram negativas (*E. coli*) o Gram positivas (*S. aureus*), se observó poco o nada de unión para rshCD5 (figura 1C) según los datos previamente descritos (39). Esto indica que, al contrario que la de CD6, la región extracelular de CD5 es bastante adecuada para el reconocimiento de estructuras de la pared celular fúngica pero no bacteriana.

Con el fin de identificar cuál de los tres dominios SRCR de la región extracelular de CD5 (CD5.DI, CD5.DII y CD5.DIII) estaba implicado en la unión fúngica, se realizaron ensayos adicionales de unión a células fúngicas completas. Para ello, se incubaron los sobrenadantes del cultivo celular de transfectantes de HEK 293-EBNA que expresaban dominios de SRCR solubles individuales de rshCD5 con 10^8 células de *C. albicans* o *C. neoformans* durante la noche a 4°C. Se eliminó mediante lavados la proteína no unida (NB) y se precipitó con ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Se sometieron a electroforesis las proteínas unidas (B) a células y que podían precipitarse con TCA en geles de SDS-PAGE y se analizaron mediante Western blot con un antisuero policlonal de conejo anti-CD5 más antisuero de oveja anti-Ig de conejo marcado con HRP, y revelado mediante quimioluminiscencia. Tal como se ilustra en la figura 1D, los tres ectodominios SRCR individuales de CD5 conservaron la capacidad para interactuar con las superficies celulares fúngicas. Esto indica que un motivo estructural conservado compartido por los tres ectodominios SRCR de CD5 es responsable de la identificación de estructuras fúngicas.

45 Ejemplo 2

Inducción de agregación de células fúngicas mediante el ectodominio soluble de CD5

50 Con el fin de investigar si la existencia de múltiples sitios de unión en el ectodominio humano de CD5 conduciría a la agregación fúngica, se incubaron suspensiones de células de *C. albicans* marcadas con FITC durante la noche a 4°C con 5 μg o 10 μg de proteínas solubles no marcadas (BSA, rshCD5 y rshCD6) y luego se analizaron mediante microscopía de epifluorescencia. En estas condiciones, rshCD5 inducía la agregación celular fúngica dependiente de dosis, mientras que ni rshCD6 ni BSA pudieron inducir un fenómeno de este tipo (Fig. 2, panel superior e intermedio). También se observaron los mismos resultados cuando se sometieron a ensayo células fúngicas de *C. neoformans*. De manera interesante, se redujo significativamente la agregación de células fúngicas inducida por rshCD5 cuando se realizaron los ensayos en presencia de cantidades en exceso (20 μg) de zimosán (de *S. cerevisiae*) o β -glucano (de cebada), pero no de manano (de *S. cerevisiae*) (Fig. 2, panel inferior). Esto demostró que la unión y la agregación de células fúngicas mediante rshCD5 son específicas y está mediada a través del reconocimiento de los componentes específicos de la pared celular fúngica, tales como β -glucanos.

60

Ejemplo 3

Unión directa del ectodominio de CD5 soluble a componentes conservados de las paredes celulares fúngicas pero no de las bacterianas

65

Para confirmar y caracterizar adicionalmente las capacidades de unión fúngica del ectodominio soluble de CD5 humano, se evaluó su unión directa a preparaciones purificadas de pared celular fúngica. Para esto se incubaron placas

de ELISA de 96 pocillos revestidos con BSA, zimosán, LPS, PGN o LTA con cantidades crecientes (desde 0,01 μg hasta 2 μg) de rshCD5 marcada con biotina. Se detectó la proteína unida mediante la adición de HRP-SAv y revelado con sustrato líquido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. Se leyó la absorbancia a 450 nm. De acuerdo a los resultados de los experimentos de unión celular fúngica y bacteriana representados en la figura 1, la rshCD5 marcada con biotina se unía a las placas revestidas con zimosán (*S. cerevisiae*) de un modo dependiente de dosis (Fig. 3A, parte superior) pero no a las placas revestidas con LPS, LTA o PGN (Fig. 3A, parte inferior). En ensayos paralelos, la rshCD6 marcada con biotina se unía a las placas revestidas con LPS, LTA o PGN de un modo dependiente de la dosis (Fig. 3B, parte inferior) tal como se esperaba (39). Se observó una dependencia de la dosis similar para rshCD6 en las placas revestidas con zimosán, aunque los valores de absorbancia fueron siempre inferiores a los obtenidos para rshCD5 (Fig. 3B y 3A, parte superior). Esto refuerza la afirmación mencionada anteriormente sobre la idoneidad del ectodominio humano de CD5 para eliminar los constituyentes de la pared celular fúngica pero no bacteriana, en comparación con el ectodominio de CD6 humano.

Se realizaron ensayos ELISA de competición adicionales para determinar la especificidad del componente de la pared celular fúngica responsable de la interacción con el ectodominio de CD5 humano. Para esto, se incubó una cantidad fija (2 μg) de rshCD5 y rshCD6 marcadas con biotina con placas de ELISA revestidas con zimosán en presencia o ausencia de cantidades crecientes (desde 0,01 μg hasta 20 μg) de competidores no marcados (β -D-glucano, zimosán, manano o BSA). Se detectó la proteína unida mediante la adición de HRP-SAv y revelado con sustrato líquido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. Se leyó la absorbancia a 450 nm. De acuerdo con los resultados de agregación fúngica mostrados en la figura 2 izquierda, β -D-glucano y zimosán pero no manano pudieron realizar la unión de rshCD5 marcada con biotina a zimosán de una manera dependiente de dosis (Fig. 4A, izquierda). Por el contrario, cuando se realizaron los mismos ensayos con rshCD6 marcada con biotina, sólo el zimosán pudo competir por la unión (Fig. 4A, derecha).

A continuación se analizó la capacidad de diferentes preparaciones que contenían β -glucanos para competir por la unión del ectodominio de CD5 humano con estructuras de la pared celular fúngica. Para esto, se hizo competir la unión de una cantidad fija de rshCD5 marcada con biotina (15 μg) a células fúngicas completas con concentraciones crecientes de β -glucano purificado a partir de cebada, β -1,3-glucano purificado a partir de *Euglena gracilis*, y glucano purificado a partir de *S. cerevisiae*, así como con zimosán o manano (ambos purificados a partir de *S. cerevisiae*) usados éstos últimos como controles positivos y negativos, respectivamente. Tras un lavado exhaustivo, se solubilizó la proteína unida y se hizo pasar sobre SDS-PAGE. Se realizó la detección de rshCD5 marcada con biotina mediante Western blot usando HRP-SAv y revelado por quimioluminiscencia. Tal como se ilustra mediante la figura 4B, todas las preparaciones de glucano usadas compitieron la unión de rshCD5 marcada con biotina a ambas suspensiones celulares, de *C. albicans* y de *C. neoformans*, de una manera dependiente de la dosis. Estos resultados mostraron que la interacción del ectodominio de CD5 humano con hongos está mediada probablemente a través del β -1,3-glucano de reconocimiento, un constituyente sumamente conservado y abundante de las paredes celulares fúngicas.

Ejemplo 4

El zimosán se une a la forma de membrana CD5 e induce la activación mediada por CD5 de la cascada MAPK

Los autores se cuestionaron a continuación si la forma unida a la membrana del receptor CD5 humano podía también interactuar con los constituyentes de la pared celular fúngica. Para esto, se investigó la unión de cantidades crecientes de zimosán marcado con FITC a células 2G5, un derivado de células Jurkat seleccionado por su expresión deficiente de los receptores CD5 y CD6, (40). Se incubaron cantidades crecientes (desde 1 μg hasta 30 μg) de zimosán marcado con FITC con células Jurkat 2G5 sin transfectar o bien transfectadas para expresar el receptor CD5 de membrana de tipo silvestre (2G5-CD5.WT). Se analizó la intensidad de fluorescencia de las células teñidas mediante citometría de flujo. Tal como se muestra en la figura 5A, la intensidad de fluorescencia de las células 2G5 que expresaban de manera estable la forma silvestre de CD5 unida a la membrana (2G5-CD5.WT) era mayor en comparación con las células 2G5 originales sin transfectar. Se obtuvo otra confirmación de los resultados a partir de los experimentos de competición de la unión a transfectantes estables de 2G5-CD5.WT, en los que se hizo competir una cantidad fija de zimosán marcado con FITC (15 μg) con concentraciones crecientes (desde 1 μg hasta 30 μg) de zimosán sin marcar (*S. cerevisiae*), β -D-glucano (cebada) y manano (*S. cerevisiae*). Se analizó la intensidad de fluorescencia de las células teñidas mediante citometría de flujo. Tal como se muestra en la figura 5B, β -glucano o bien zimosán pero no manano pudieron competir por la unión de zimosán marcado con FITC de una manera dependiente de la dosis. Estos resultados confirman los obtenidos para rshCD5 y muestran que las células que expresan CD5 en su membrana detectan la presencia de constituyentes de la pared celular fúngica.

Se obtuvieron pruebas adicionales sobre la unión de zimosán a la forma unida a la membrana de CD5 a partir de la activación de miembros de la cascada de señalización MAPK en transfectantes de 2G5 estables que expresaban las formas de tipo silvestre (2G5-CD5.WT) o truncadas en la cola citoplasmática (2G5-CD5.K384^{stop}) de CD5 (41). Para esto, se estimularon 2×10^6 células 2G5 sin transfectar o transfectadas durante diferentes tiempos (de 0 min. a 30 min.) con 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de zimosán a 37°C. Posteriormente se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE muestras de lisados celulares y se analizaron mediante Western blot con antisuero policlonal de conejo anti-ERK1/2 fosforilada (pERK1/2), antisuero monoclonal de ratón anti-MEK fosforilada (pMEK) y antisuero policlonal de conejo anti-cdk4, el último usado como control de carga. Tras un lavado exhaustivo, se revelaron las membranas mediante quimioluminiscencia tras incubación con antisuero de oveja anti-Ig de conejo o de ratón marcado con HRP respectivamente. Tal

como se muestra en la figura 6A, la exposición a zimosán inducía una fosforilación dependiente del tiempo de MEK y ERK1/2, en células 2G5-CD5.WT pero no en las células 2G5 sin transfectar parentales. De manera interesante, no se observó la fosforilación inducida por zimosán de ambas MEK y ERK1/2 en transfectantes de 2G5-CD5.K384^{stop} (Fig. 6A, derecha), que expresan una forma de CD5 truncada de su cola citoplasmática y que carece de los 88 aminoácidos más C terminales (41). Esto indica que la activación de la cascada MAPK mediante zimosán en células 2G5 depende de la expresión de CD5 así como de la integridad de su dominio citoplasmático.

Ejemplo 5

Zimosán induce la liberación de citocinas mediada por CD5

En un intento por explorar adicionalmente las consecuencias biológicas de la unión de constituyentes de la pared celular fúngica a CD5 unido a la membrana, los autores decidieron analizar los fenómenos de liberación de citocinas. Desafortunadamente, la estimulación de células 2G5, parentales y transfectadas, no dieron como resultado la liberación de citocinas significativa en diferentes puntos de tiempo. Esta falta de respuesta se observó no sólo tras la exposición a altas concentraciones de zimosán sino también a potentes estímulos específicos de células T tales como combinaciones de AcM anti-CD3 y anti-CD28, indicando así la posible existencia de un bloqueo de liberación de citocinas en células 2G5.

A la vista de estas observaciones se expresó la forma unida a la membrana de CD5 en un sistema de células de mamífero no linfoides, las células de riñón embrionario humano (HEK) 293. Tanto las células HEK 293 originales como un transfectante de la célula HEK 293 que expresa de manera estable TLR2, un receptor bien conocido para zimosán, se transfectaron de manera transitoria para la expresión de las formas de tipo silvestre (CD5.WT) y truncada de la cola citoplasmática (CD5.K384^{stop}) de CD5 humano. Después se sometieron células a exposición a zimosán (20 µg/ml) durante 24 h y se midió la concentración de IL-8 en sobrenadantes de cultivo celular (100 µl) mediante ELISA. Tal como se muestra en la figura 6B, se observó una liberación significativa de IL-8 para células HEK 293 que expresaban CD5.WT en comparación con células sin transfectar o bien células que expresaban la molécula de CD5.K384^{stop} truncada. Cabe destacar que los niveles de IL-8 detectados para células HEK 293 que expresaban CD5.WT fueron similares a los observados para transfectantes que expresaban TLR2, usados como control positivo. Además, la co-expresión de CD5.WT y TLR2 no dio como resultado efectos aditivos ni sinérgicos tras la exposición a zimosán. Tomados juntos, estos resultados indican que la forma unida a la membrana de CD5 puede detectar la presencia de constituyentes de pared celular fúngica y esto inicia una cascada de señalización independiente que da como resultado la liberación de citocinas.

Ejemplo 6

La administración del ectodominio de CD5 soluble protege frente al síndrome del shock séptico inducido por zimosán en ratones

Se obtuvo una validación adicional *in vivo* sobre la unión del ectodominio de CD5 a constituyentes de pared celular fúngica a partir del modelo de ratón de síndrome del shock séptico inducido por zimosán (42). Se evaluó si rshCD5 prevenía la inflamación sistémica y el fallo multiorgánico inducido tras la administración i.p. de una única dosis alta de zimosán (500 mg/kg). En estas condiciones, zimosán produce peritonitis aguda y fallo multiorgánico en el plazo de 18 h así como aumento de la mortalidad en ratones a lo largo de un periodo de 12 días. Con este fin, se asignaron ratones CD1 en los siguientes grupos: BSA + ZYM, ratones pretratados con BSA (25 µg; i.p.) 1 h antes de tratarse con zimosán (500 mg/kg; i.p.); rshCD5 + ZYM, ratones pretratados con rshCD5 (25 µg; i.p.) 1 h antes de tratarse con zimosán (500 mg/kg; i.p.); BSA, ratones tratados con BSA (25 µg; i.p.) sola. Tal como se muestra en la figura 7 A-E, la administración de una única dosis i.p. de 25 µg de rshCD5 en ratones 1 h antes de la exposición a zimosán indujo una reducción significativa sobre la puntuación de toxicidad (Fig. 7A), el recuento de leucocitos totales en la cavidad peritoneal (Fig. 7B), niveles plasmáticos en sangre de IL-6 y IL-1β (Fig. 7C) e infiltración de neutrófilos del hígado según se mide mediante actividad mieloperoxidasa (MPO) (Fig. 7D) a las 18 h. En otro conjunto de experimentos, se controló la supervivencia de ratones y se observó un aumento significativo (el 45% frente al 15%) al final del periodo de observación (12 días) para los animales que recibieron una única dosis i.p. de rshCD5 antes de la exposición a zimosán en comparación con los controles (figura 7E). Tomados juntos, estos resultados indican que el pretratamiento de ratones con rshCD5 previene la inflamación sistémica dañina inducida por zimosán y revela el potencial terapéutico de rshCD5 para el shock séptico fúngico.

60 *Materiales y procedimientos*

Construcciones. La generación de constructos de expresión para proteínas solubles rshCD5 (43), rshCD5.DIII (5) y rshCD6 (22) ya ha sido descrita previamente. Se amplificaron por PCR los ectodominios DI y DII de rshCD5 usando los siguientes cebadores: DI directo (SEQ ID NO 1) e inverso (SEQ ID NO 2); DII directo (SEQ ID NO 3) e inverso (SEQ ID NO 4). Se restringió la PCR con *NheI* y *BamHI* y se clonó en un vector pCEP-Pu digerido de manera apropiada. Se transfectaron las construcciones resultantes en células HEK 293-EBNA tal como se describió anteriormente (44, 45). Se transfectaron de manera transitoria las construcciones de expresión que codifican las formas unida a membrana de tipo natural (pHβ-CD5.WT) y truncada de la cola citoplasmática (pHβ-CD5.K384^{STOP}) de CD5

ES 2 336 752 B1

(41) en células HEK 293 usando Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen Life Technologies, Paisley, RU) según las instrucciones del fabricante.

5 *Células.* Se obtuvieron las células 2G5 negativas para CD5 y para CD6 mediante clasificación de células y clonación adicional de células Jurkat (40) y se cultivaron en medio BioWhittaker RPMI 1640 médium (Lonza, Verviers, Bélgica) complementado con FCS al 10% (Invitrogen Life Technologies), 100 U/ml de penicilina G (Laboratorios ERN, Barcelona, España) y 50 µg/ml de estreptomina (Laboratorios Normon, Madrid, España) a 37°C y CO₂ al 5%. Las células embrionarias de riñón humano HEK 293-EBNA expresan de manera constitutiva la proteína del virus Epstein-Barr EBNA-1, permitiendo la replicación episomal del vector pCEP-Pu, un generoso regalo del Dr. T. Sasaki y Dr. Timpl (Max Planck Institute for Biochemistry, Martinsried, Alemania). Se hicieron crecer estas células en
10 DMEM/F12, complementado con FCS al 10%, 100 U/ml de penicilina G, 50 µg/ml de estreptomina, 250 µg/ml de geneticina (G418, Sigma, St Louis, MO). Puomicina 50 µg/ml (Sigma) fue añadido al medio de cultivo de las células HEK 293 transfectadas y células HEK 293 que expresaban de manera estable TLR2, las cuales fueron un generoso regalo del Dr. Golenbock (University of Massachusetts Medical School, Worcester, EE.UU.).

15 *Expresión, purificación por afinidad y mareaje con biotina de proteínas recombinantes.* Se expresaron todas las proteínas humanas solubles recombinantes rshCD5, rshCD6, rshCD5.DI, rshCD5.DII y rshCD5.DIII usando el sistema de expresión episomal pCEP-Pu/HEK 293-EBNA. Se purificaron las proteínas rshCD5 y rshCD6 a partir de sobrenadantes de cultivo mediante cromatografía de afinidad con anticuerpos específicos (22, 43). Los ectodominios individuales de rshCD5 abarcaban aminoácidos R1-L113 (DI), A135-F271 (DII) y F271-D369 (DIII) de la proteína madura, y se usaron como sobrenadantes de cultivo libre de suero sin fraccionar. Se realizó el mareaje de proteínas con biotina activada por PEO-maleimida EZ-Link (Pierce/Perbo Science, Cheshire, R.U.) según las instrucciones del fabricante.

20 *Estudios de unión bacteriana y fúngica.* Las cepas bacterianas (*S. aureus* y *E. coli*) y fúngicas (*C. albicans* y *C. neoformans*) usadas en este estudio son aislados clínicos caracterizados por el Departamento de Microbiología del Hospital Clínico de Barcelona usando procedimientos bioquímicos habituales. La cepa fúngica *S. pombe* fue proporcionada generosamente por el Departamento de Patología y Biología Celular de la Universidad de Barcelona. Se hicieron crecer las bacterias u hongos durante la noche en medio de Luria Bertoni (LB) a 30-37°C con aireación y después se recogieron mediante centrifugación a 3.500xg durante 10 min. Volvieron a suspenderse los sedimentos bacterianos o fúngicos en TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) hasta una densidad final de 10¹⁰ bacterias o 10⁸ hongos por ml. Se realizó la cuantificación sembrando en placa diluciones de bacterias/hongos sobre agar. Se analizó la unión de proteínas solubles recombinantes (rshCD5, rshCD6) tal como se describe anteriormente (14).

25 Para los ensayos de competición se incubaron previamente 15 µg de rshCD5 con diferentes concentraciones de zimosán purificado de *S. cerevisiae* (Sigma), β-1-3-glucano de *Euglena gracilis* (Sigma), glucano de *S. cerevisiae* (Sigma) y β-D-glucano de cebada, (Sigma) o manano de *S. cerevisiae* (Sigma), durante 1 h a 4°C, antes de la incubación con suspensiones bacterianas o fúngicas. Se realizaron los estudios de unión fúngica con los ectodominios DI, DII y DIII de rshCD5, incubando 10⁶ hongos con 1 ml de sobrenadantes de cultivo respectivos durante la noche a 4°C con rotación. Se evaluó la proteína no unida mediante precipitación con TCA al 10%. Estas muestras y las muestras de
40 proteína unida se solubilizaron con tampón de muestra de Laemmli, se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE y se analizaron mediante Western blot con suero polyclonal de conejo anti-CD5 desarrollado en nuestro laboratorio más un suero anti-Ig de conejo producido en oveja marcado con HRP (DAKO, Carpintería, CA).

45 *Ensayos ELISA.* Se revistieron durante la noche placas de ELISA de microtitulación de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) a 4°C con 20 µg de LPS (purificado de *E. coli* 055.B5, Sigma), ácido lipoteicoico (LTA, Sigma), peptidoglicano (PGN, Sigma) o zimosán en tampón de revestimiento (NaHCO₃ 100 mM, pH 9,5). Se bloquearon las placas durante 1 h a temperatura ambiente (TA) con PBS que contenía BSA al 3% (Sigma). Después se añadieron diferentes concentraciones de BSA, rshCD5 o rshCD6 marcados con biotina a los pocillos y se incubaron durante 2 h a TA. Se detectó la proteína unida mediante la adición de una dilución 1:2000 de HRP-estreptavidina (Roche
50 Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) durante 1 h a TA. Tras cada etapa de incubación, la proteína no unida se eliminó mediante lavado tres veces con PBS más Tween-20 al 0,01%. Se reveló añadiendo sustrato líquido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma), y se leyó la absorbancia a 450 nm.

55 Se realizaron ensayos ELISA de competición tal como anteriormente excepto porque se incubaron previamente 2 µg de rshCD5 o de rshCD6 con diferentes concentraciones de zimosán, β-D-glucano o manano durante 1 h a 4°C, antes de la adición a placas revestidas con zimosán.

60 Las determinaciones de suero de IL-6 y IL-1β mediante ELISA se realizaron según las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN).

65 *Ensayos de agregación fúngica.* Se realizó el mareaje por fluorescencia de diferentes cepas fúngicas mediante la incubación con FITC 100 mM durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Se recogieron las células mediante centrifugación a 3.000xg durante 5 min y tras varios lavados en PBS para eliminar FITC no unido, volvieron a suspenderse los hongos en 300 µl de PBS. Se añadieron 5 µg o 10 µg de rshCD5 o de rshCD6 y se incubaron durante la noche a 4°C con una rotación orbital suave. Para los ensayos de competición 10 µg de rshCD5 o rshCD6 fueron pre-incubados durante 1 h a 4°C con 20 µg de zimosán, β-D-glucano o manano. Se transfirieron 10 µl de la suspensión sobre portaobjetos de vidrio y se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania). Se analizaron las imágenes con Photoshop 7.0 (Adobe Systems, San José, CA).

ES 2 336 752 B1

Análisis por citometría de flujo. Se realizó la unión de zimosán a células 2G5 o 2G5-CD5.WT incubando 2×10^5 células con diferentes cantidades de zimosán marcado con FITC de *S. cerevisiae* (Sigma) en tampón de bloqueo (PBS, suero AB humano al 10%, FCS al 2% y azida sódica al 0,02%). Tras una incubación de 1 h a 4°C, se lavaron las células con PBS, FCS al 2% y azida sódica al 0,02% y se analizaron en un FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Los ensayos de competición se realizaron incubando células con 15 μg de zimosán marcado con FITC en presencia de diferentes cantidades de zimosán, β -D-glucano o manano sin marcar.

Ensayos de liberación de citocinas IL-8. Se transfectaron mediante Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante, células HEK 293 y células HEK 293 que expresaban de manera estable TLR2, con pH β -CD5.WT o pH β -CD5.K384^{STOP}. A las 24 h tras la transfección se sometieron a pulsos las células durante otras 24 h con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de zimosán y se sometieron a ensayo muestras de 100 μl de sobrenadantes para determinar la concentración de IL-8 usando un kit ELISA (BD OptEIA™, Human IL-8 ELISA Set, BD Biosciencias, San Diego, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sometió a ensayo la expresión de la proteína CD5 mediante SDS-PAGE y Western blot con un antisuero policlonal de conejo anti-CD5 producido en el laboratorio más un antisuero de oveja marcado con HRP y revelado mediante quimioluminiscencia.

Ensayos de MAP cinasas. Para fines de estimulación, se privó a 2×10^7 células 2G5, 2G5-CD5.WT o 2G5-CD5.K384^{STOP} durante 24 h en medio RPMI1640 sin FCS. A continuación, se suspendieron las células en 300 μl de medio fresco durante 10 min a 37°C y se estimularon con 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de zimosán durante 0, 5, 15 ó 30 min a 37°C. Se lisaron las células en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM y Tritón X-100 al 0,1% que contenía 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina y PMSF 1 mM). Se midió el contenido en proteína del extracto celular mediante el procedimiento de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA) y se analizaron muestras de 20-30 μg de proteína mediante SDS-PAGE y se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA). Se incubaron las membranas con TBS-T (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05%) que contenía un 5% de leche desnatada en polvo durante 1 h a TA y después se analizó durante la noche a 4°C con agitación con antisueros policlonal de conejo anti-pERK1/2 (sc-101760, dilución 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) o monoclonal de ratón anti-pMEK (sc-81503, dilución 1:1000, Santa Cruz) o policlonal de conejo anti-cdk4 (sc-260, dilución 1:200; Santa Cruz). Tras lavar tres veces con TBS-T, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario marcado con HRP correspondiente (dilución 1:2000, DAKO) durante 45 min a TA. Se lavaron tres veces con TBS-T, y una vez con TBS y se visualizaron mediante quimioluminiscencia potenciada con Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce) y exposición a películas de X-OMAT (Kodak, Rochester, NY).

Síndrome del shock séptico inducido por zimosán. Se inyectó por vía i.p. zimosán (500 mg/kg) en 250 μl de solución salina estéril (46) a ratones macho de la cepa CD1 que pesaban 20-22 g (Charles River, Milán, Italia). Se administró una única dosis i.p. de 25 μg de rshCD5 o bien de BSA 1 h antes de la exposición a zimosán. Un tercer grupo de ratones recibió el mismo volumen de solución salina estéril con una administración previa de 25 μg de BSA. 18 h tras la exposición a zimosán se puntuó la gravedad clínica de la toxicidad sistémica en una escala subjetiva que oscilaba entre 0 y 3 en la que 0 = ausencia, 1 = leve, 2 = moderada, 3 = grave. Se usó dicha escala para cada signo tóxico observado en los ratones (letargia, diarrea, pelo erizado y conjuntivitis). Se sumaron los valores de cada signo tóxico de cada grupo, proporcionando una puntuación final.

Para la evaluación del recuento de leucocitos totales en el peritoneo, se inyectaron 5 ml de PBS en la cavidad abdominal a través de una incisión en la línea alba, y se recuperó el mismo volumen tras un masaje peritoneal de 10 segundos. Se realizaron mediciones con un contador celular automático (Micros 60, ABX Diagnostics, Montpellier, Francia). Se congelaron muestras de hígado en nitrógeno líquido hasta que se usaron para la evaluación de la actividad mieloperoxidasa (MPO) tal como se describe anteriormente (47).

Se controló la mortalidad de cada grupo durante un periodo de 12 días y se expresó como porcentaje de ratones supervivientes. Se aprobó el procedimiento experimental por el comité ético de la Universidad de Barcelona y se realizó de acuerdo con las directrices institucionales del cuidado de animales que cumplen con los reglamentos en España (RD 1201/2005), Europa (86/609) y la guía de los Institutos Nacionales de la Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

Análisis estadísticos. Los resultados se presentan como valores medios \pm EEM. Se usaron pruebas de la t para datos independientes para fines de determinación de la significación estadística. Se analizó la supervivencia por medio de una prueba de rango logarítmico. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Bibliografía

1. **Janeway, C. A., Jr., and R. Medzhitov.** 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
2. **Gordon, S.** 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111:927-930.
3. **Freeman, M., J. Ashkenas, D. J. Rees, D. M. Kingsley, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and M. Krieger.** 1990. An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8810-8814.

ES 2 336 752 B1

4. **Sarrias, M. R., J. Gronlund, O. Padilla, J. Madsen, U. Holmskov, and F. Lozano.** 2004. The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit Rev Immunol* 24:1-37.
5. **Rodamilans, B., I. G. Muñoz, E. Bragado-Nilsson, M. R. Sarrias, O. Padilla, F. J. Blanco, F. Lozano, and G. Montoya.** 2007. Crystal structure of the third extracellular domain of CD5 reveals the fold of a group B scavenger cysteine-rich receptor domain. *J Biol Chem* 282:12669-12677.
6. **Liu, Y., and S. Shaw.** 2001. The human genome: an immuno-centric view of evolutionary strategies. *Trends Immunol* 22:227-229.
7. **Bodian, D. L., J. E. Skonier, M. A. Bowen, M. Neubauer, A. W. Siadak, A. Aruffo, and J. Bajorath.** 1997. Identification of residues in CD6 which are critical for ligand binding. *Biochemistry* 36:2637-2641.
8. **Skonier, J. E., D. L. Bodian, J. Emswiler, M. A. Bowen, A. Aruffo, and J. Bajorath.** 1997. Mutational analysis of the CD6 ligand binding domain. *Protein Eng* 10:943-947.
9. **Kristiansen, M., J. H. Graversen, C. Jacobsen, O. Sonne, H. J. Hoffman, S. K. Law, and S. K. Moestrup.** 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409:198-201.
10. **Doi, T., K. Higashino, Y. Kurihara, Y. Wada, T. Miyazaki, H. Nakamura, S. Uesugi, T. Imanishi, Y. Kawabe, H. Itakura, and et al.** 1993. Charged collagen structure mediates the recognition of negatively charged macromolecules by macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem* 268:2126-2133.
11. **Elomaa, O., M. Sankala, T. Pikkarainen, U. Bergmann, A. Tuuttila, A. Raatikainen-Ahokas, H. Sariola, and K. Tryggvason.** 1998. Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacteria-binding region. *J Biol Chem* 273:4530-4538.
12. **Jiang, Y., P. Oliver, K. E. Davies, and N. Platt.** 2006. Identification and characterization of murine SCARA5, a novel class A scavenger receptor that is expressed by populations of epithelial cells. *J Biol Chem* 281:11834-11845.
13. **Peiser, L., P. J. Gough, T. Kodama, and S. Gordon.** 2000. Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions *in vitro*. *Infect Immun* 68:1953-1963.
14. **Sarrias, M. R., S. Rosello, F. Sanchez-Barbero, J. M. Sierra, J. Vila, J. Yelamos, J. Vives, C. Casals, and F. Lozano.** 2005. A role for human Sp alpha as a pattern recognition receptor. *J Biol Chem* 280:35391-35398.
15. **Lecomte, O., J. B. Bock, B. W. Birren, D. Vollrath, and J. R. Parnes.** 1996. Molecular linkage of the mouse CD5 and CD6 genes. *Immunogenetics* 44:385-390.
16. **Padilla, O., J. Calvo, J. M. Vila, M. Arman, I. Gimferrer, L. Places, M. T. Arias, M. A. Pujana, J. Vives, and F. Lozano.** 2000. Genomic organization of the human CD5 gene. *Immunogenetics* 51:993-1001.
17. **Berland, R., and H. H. Wortis.** 2002. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* 20:253-300.
18. **Jones, N. H., M. L. Clabby, D. P. Dialynas, H. J. Huang, L. A. Herzenberg, and J. L. Strominger.** 1986. Isolation of complementary DNA clones encoding the human lymphocyte glycoprotein T1/Leu-1. *Nature* 323:346-349.
19. **Aruffo, A., M. B. Melnick, P. S. Linsley, and B. Seed.** 1991. The lymphocyte glycoprotein CD6 contains a repeated domain structure characteristic of a new family of cell surface and secreted proteins. *J Exp Med* 174:949-952.
20. **Lankester, A. C., G. M. van Schijndel, J. L. Cordell, C. J. van Noesel, and R. A. van Lier.** 1994. CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex. *Eur J Immunol* 24:812-816.
21. **Gimferrer, I., M. Farnos, M. Calvo, M. Mittelbrunn, C. Enrich, F. Sanchez-Madrid, J. Vives, and F. Lozano.** 2003. The accessory molecules CD5 and CD6 associate on the membrane of lymphoid T cells. *J Biol Chem* 278:8564-8571.
22. **Gimferrer, I., M. Calvo, M. Mittelbrunn, M. Farnos, M. R. Sarrias, C. Enrich, J. Vives, F. Sanchez-Madrid, and F. Lozano.** 2004. Relevance of CD6-mediated interactions in T cell activation and proliferation. *J Immunol* 173:2262-2270.
23. **Lozano, F., M. Simarro, J. Calvo, J. M. Vila, O. Padilla, M. A. Bowen, and K. S. Campbell.** 2000. CD5 signal transduction: positive or negative modulation of antigen receptor signaling. *Crit Rev Immunol* 20:347-358.

24. **Brossard, C., M. Semichon, A. Trautmann, and G. Bismuth.** 2003. CD5 Inhibits Signaling at the Immunological Synapse Without Impairing Its Formation. *J Immunol* 170:4623-4629.
25. **Hassan, N. J., A. N. Barclay, and M. H. Brown.** 2004. Frontline: Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166. *Eur J Immunol* 34:930-940.
26. **Zimmerman, A. W., B. Joosten, R. Torensma, J. R. Parnes, F. N. van Leeuwen, and C. G. Figdor.** 2006. Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood* 107:3212-3120.
27. **Raman, C.** 2002. CD5, an important regulator of lymphocyte selection and immune tolerance. *Immunol Res* 26:255-263.
28. **Ibanez, A., M. R. Sarrias, M. Farnos, I. Gimferrer, C. Serra-Pages, J. Vives, and F. Lozano.** 2006. Mitogen-activated protein kinase pathway activation by the CD6 lymphocyte surface receptor. *J Immunol* 177:1152-1159.
29. **Hassan, N. J., S. J. Simmonds, N. G. Clarkson, S. Hanrahan, M. J. Puklavec, M. Bomb, A. N. Barclay, and M. H. Brown.** 2006. CD6 regulates T-cell responses through activation-dependent recruitment of the positive regulator SLP-76. *Mol Cell Biol* 26:6727-6738.
30. **Castro, M. A., M. I. Oliveira, R. J. Nunes, S. Fabre, R. Barbosa, A. Peixoto, M. H. Brown, J. R. Parnes, G. Bismuth, A. Moreira, B. Rocha, and A. M. Carmo.** 2007. Extracellular isoforms of CD6 generated by alternative splicing regulate targeting of CD6 to the immunological synapse. *J Immunol* 178:4351-4361.
31. **Van de Velde, H., I. von Hoegen, W. Luo, J. R. Parnes, and K. Thielemans.** 1991. The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Nature* 351:662-665.
32. **Biancone, L., M. A. Bowen, A. Lim, A. Aruffo, G. Andres, and I. Stamenkovic.** 1996. Identification of a novel inducible cell-surface ligand of CD5 on activated lymphocytes. *J Exp Med* 184:811-819.
33. **Calvo, J., L. Places, O. Padilla, J. M. Vila, J. Vives, M. A. Bowen, and F. Lozano.** 1999. Interaction of recombinant and natural soluble CD5 forms with an alternative cell surface ligand. *Eur J Immunol* 29:2119-2129.
34. **Pospisil, R., M. G. Fitts, and R. G. Mage.** 1996. CD5 is a potential selecting ligand for B cell surface immunoglobulin framework region sequences. *J Exp Med* 184:1279-1284.
35. **Haas, K. M., and D. M. Estes.** 2001. The identification and characterization of a ligand for bovine CD5. *J Immunol* 166:3158-3166.
36. **Hohenester, E., T. Sasaki, and R. Timpl.** 1999. Crystal structure of a scavenger receptor cysteine-rich domain sheds light on an ancient superfamily. *Nat Struct Biol* 6:228-232.
37. **Calvo, J., L. Places, G. Espinosa, O. Padilla, J. M. Vila, N. Villamor, M. Ingelmo, T. Gallart, J. Vives, J. Font, and F. Lozano.** 1999. Identification of a natural soluble form of human CD5. *Tissue Antigens* 54:128-137.
38. **Ramos-Casals, M., J. Font, M. Garcia-Carrasco, J. Calvo, L. Places, O. Padilla, R. Cervera, M. A. Bowen, F. Lozano, and M. Ingelmo.** 2001. High circulating levels of soluble scavenger receptors (sCD5 and sCD6) in patients with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 40:1056-1059.
39. **Sarrias, M. R., M. Farnos, R. Mota, F. Sanchez-Barbero, A. Ibanez, I. Gimferrer, J. Vera, R. Fenutria, C. Casals, J. Yelamos, and F. Lozano.** 2007. CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns and protects from LPS-induced septic shock. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:11724-11729.
40. **Simarro, M., C. Pelassy, J. Calvo, L. Places, C. Aussel, and F. Lozano.** 1997. The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent and -independent diacylglycerol production. *J Immunol* 159:4307-4315.
41. **Calvo, J., J. M. Vilda, L. Places, M. Simarro, O. Padilla, D. Andreu, K. S. Campbell, C. Aussel, and F. Lozano.** 1998. Human CD5 signaling and constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues by casein kinase II. *J Immunol* 161:6022-6029.
42. **Genovese, T., R. Di Paola, P. Catalano, J. H. Li, W. Xu, E. Massuda, A. P. Caputi, J. Zhang, and S. Cuzzocrea.** 2004. Treatment with a novel poly(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor reduces development of septic shock-like syndrome induced by zymosan in mice. *Crit Care Med* 32:1365-1374.
43. **Sarrias, M. R., O. Padilla, Y. Monreal, M. Carrascal, J. Abian, J. Vives, J. Yelamos, and F. Lozano.** 2004. Biochemical characterization of recombinant and circulating human Spalpha. *Tissue Antigens* 63:335-344.

ES 2 336 752 B1

44. **Nischt, R., J. Pottgiesser, T. Krieg, U. Mayer, M. Aumailley, and R. Timpl.** 1991. Recombinant expression and properties of the human calcium-binding extracellular matrix protein BM-40. *Eur J Biochem* 200:529-536.

5 45. **Kohfeldt, E., P. Maurer, C. Vannahme, and R. Timpl.** 1997. Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett* 414:557-561.

10 46. **Genovese, T., R. Di Paola, P. Catalano, J. H. Li, W. Xu, E. Massuda, A. P. Caputi, J. Zhang, and S. Cuzzocrea.** 2004. Treatment with a novel poly(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor reduces development of septic shock-like syndrome induced by zymosan in mice. *Crit Care Med* 32:1365-1374.

10 47. **Mota, R. A., D. Hernandez-Espinosa, L. Galbis-Martinez, A. Ordonez, A. Minano, P. Parrilla, V. Vicente, J. Corral, and J. Yelamos.** 2008. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition increases expression of heat shock proteins and attenuates heat stroke-induced liver injury. *Crit Care Med* 36:526-534.

15 48. **Santoni G. et al:** "Immune cell-mediated protection against vaginal candidiasis: evidence for a major role of vaginal CD4+ T cells and possible participation of other local lymphocyte effectors" *Infect. Immun.* Vol. 70(9), (2002):4791-4797.

20 49. **Levitz S. M. et al:** "Phenotypic and functional characterization of human lymphocytes activated by interleukin 2 to directly inhibit growth of *Cryptococcus neoformans in vitro*" *J. Clini. Invest.* (1993) Vol.91:1490-1498.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 336 752 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende el ectodominio soluble de CD5 y al menos un excipiente farmacéutico.
2. Composición según la reivindicación 1 en forma inyectable.
- 10 3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para la prevención y/o el tratamiento de una infección fúngica y/o septicemia fúngica y/o cualquier trastorno inflamatorio desencadenado por componentes fúngicos.
4. Composición según la reivindicación 1, en la que la infección y/o septicemia y/o el trastorno inflamatorio se produce por *Candida albicans* o *Criptococcus neoformans*.
- 15 5. Uso del ectodominio soluble de CD5 para el reconocimiento de β -glucanos.
6. Uso del ectodominio soluble de CD5 para agregar células fúngicas y/o componentes de la pared celular fúngica ricos en β -glucanos.
- 20 7. Uso del ectodominio de CD5 soluble para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una infección fúngica y/o septicemia fúngica y/o cualquier trastorno inflamatorio desencadenado por componentes fúngicos.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que la infección y/o septicemia y/o el trastorno inflamatorio se produce por *Candida albicans* o *Criptococcus neoformans*.
- 25 9. Procedimiento para obtener un ectodominio DI de CD5 soluble humano recombinante que comprende:
- 30 a) la amplificación del ectodominio DI por PCR usando los cebadores de secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2,
- b) la clonación del fragmento amplificado en un vector de expresión, y
- c) la expresión y purificación del ectodominio DI de CD5 soluble humano recombinante.
- 35 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el vector de expresión empleado en b) es pCEP-Pu.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la expresión del ectodominio DI de CD5 soluble humano recombinante se lleva a cabo en células HEK 293-EBNA.
- 40 12. Procedimiento para obtener un ectodominio DII de CD5 soluble recombinante que comprende:
- 45 a) la amplificación del ectodominio DII por PCR usando los cebadores de las secuencias SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.
- b) la clonación del fragmento amplificado en un vector de expresión, y
- c) la expresión y purificación del ectodominio DII de CD5 recombinante.
- 50 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que el vector de expresión empleado en b) es pCEP-Pu.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la expresión del ectodominio DII de CD5 humano recombinante soluble se lleva a cabo en células HEK 293-EBNA.
- 55 15. Oligonucleótido con secuencia mostrada en la SEQ ID NO 1.
16. Oligonucleótido con secuencia mostrada en la SEQ ID NO 2.
- 60 17. Oligonucleótido con secuencia mostrada en la SEQ ID NO 3.
18. Oligonucleótido con secuencia mostrada en la SEQ ID NO 4.
- 65

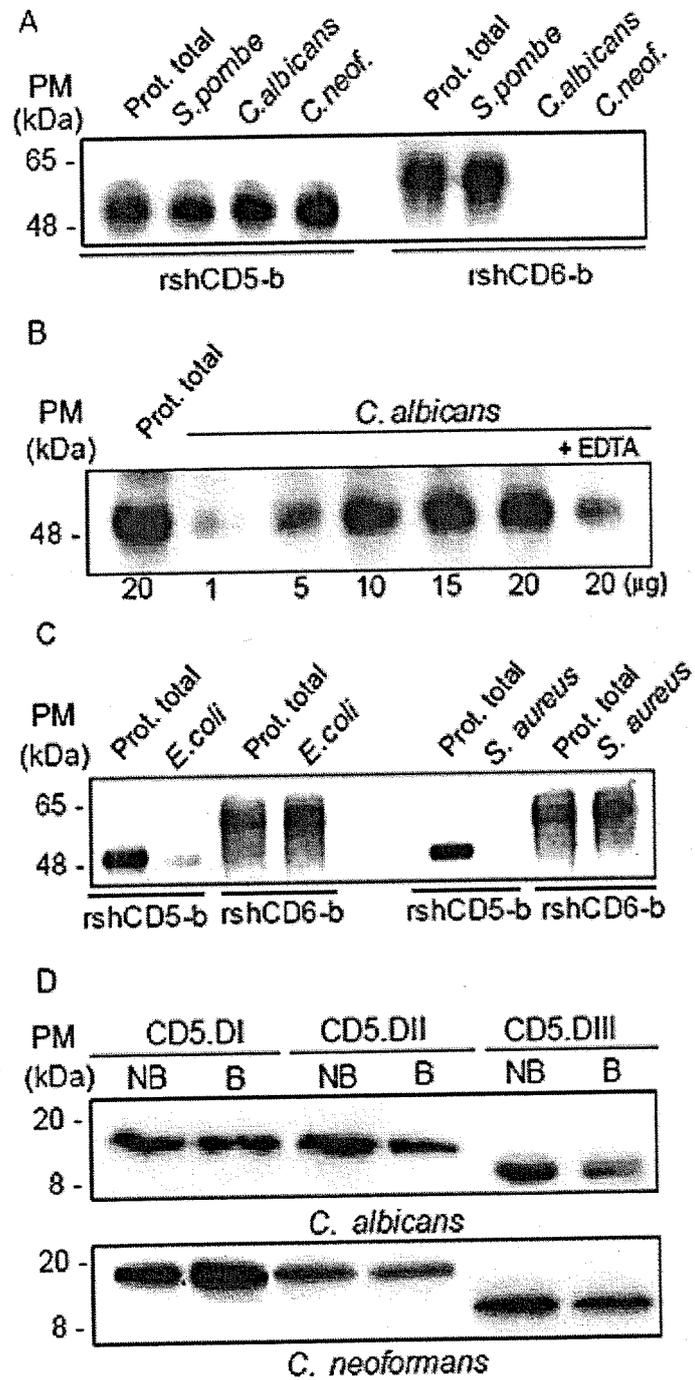


FIGURA 1

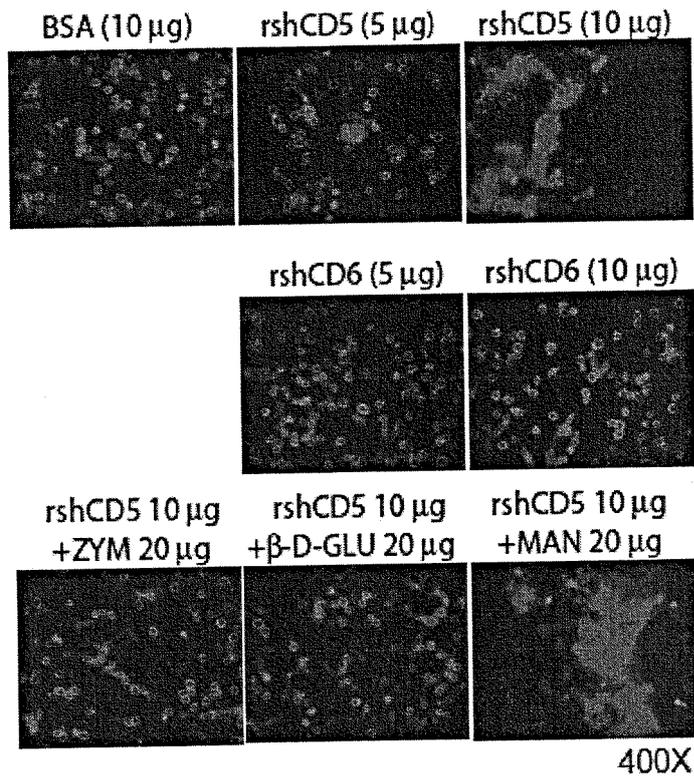


FIGURA 2

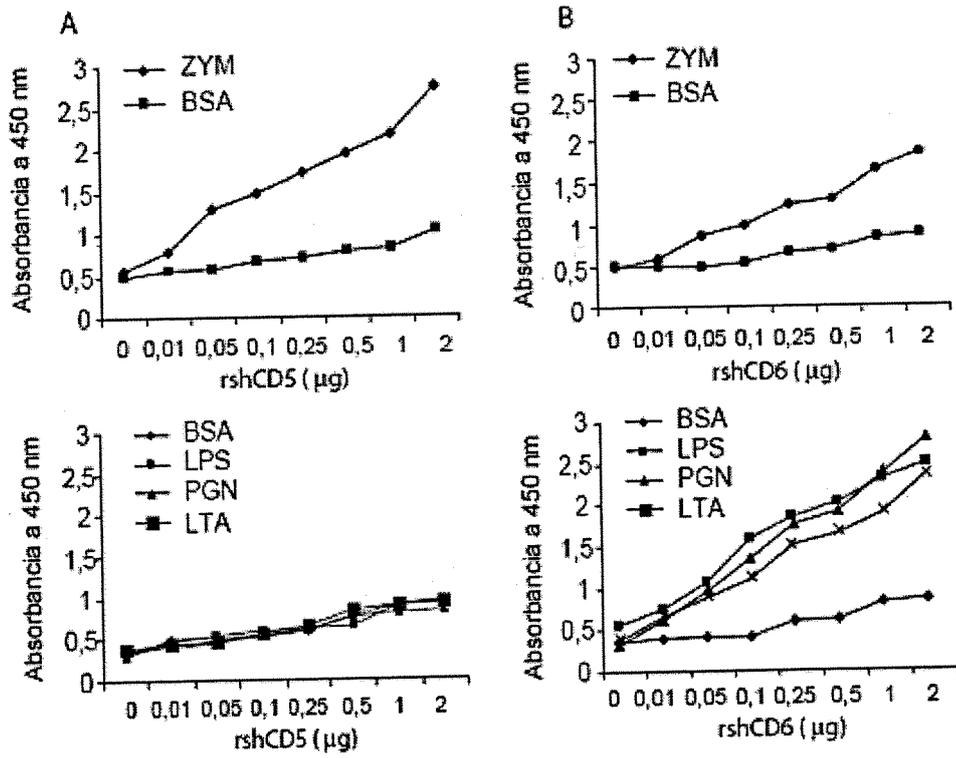


FIGURA 3

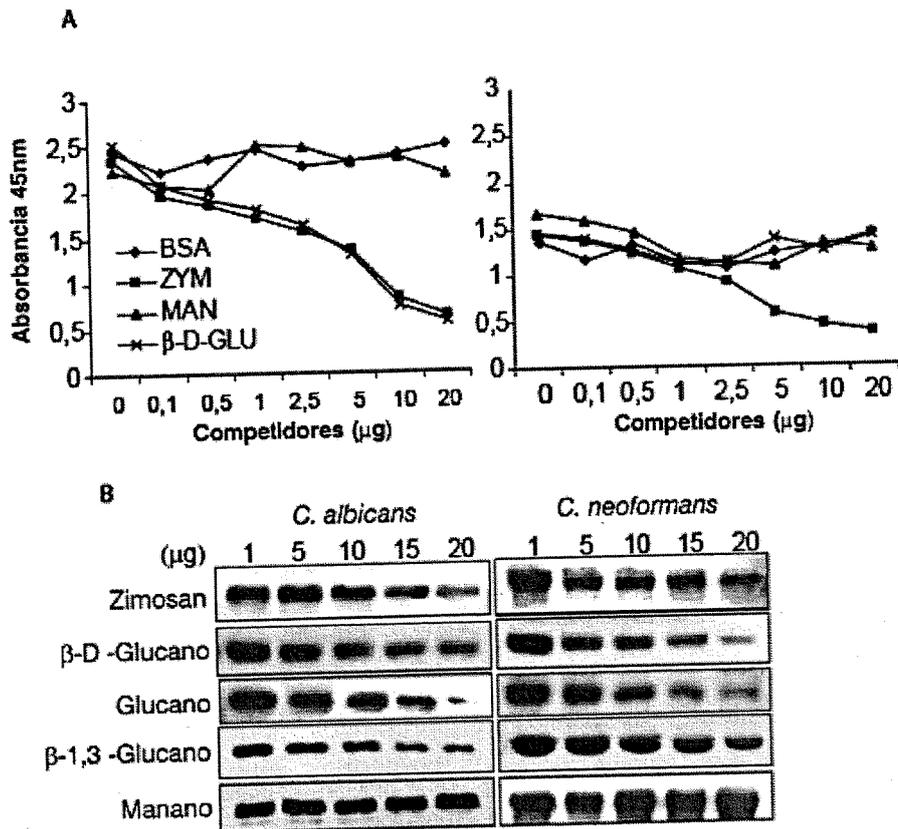


FIGURA 4

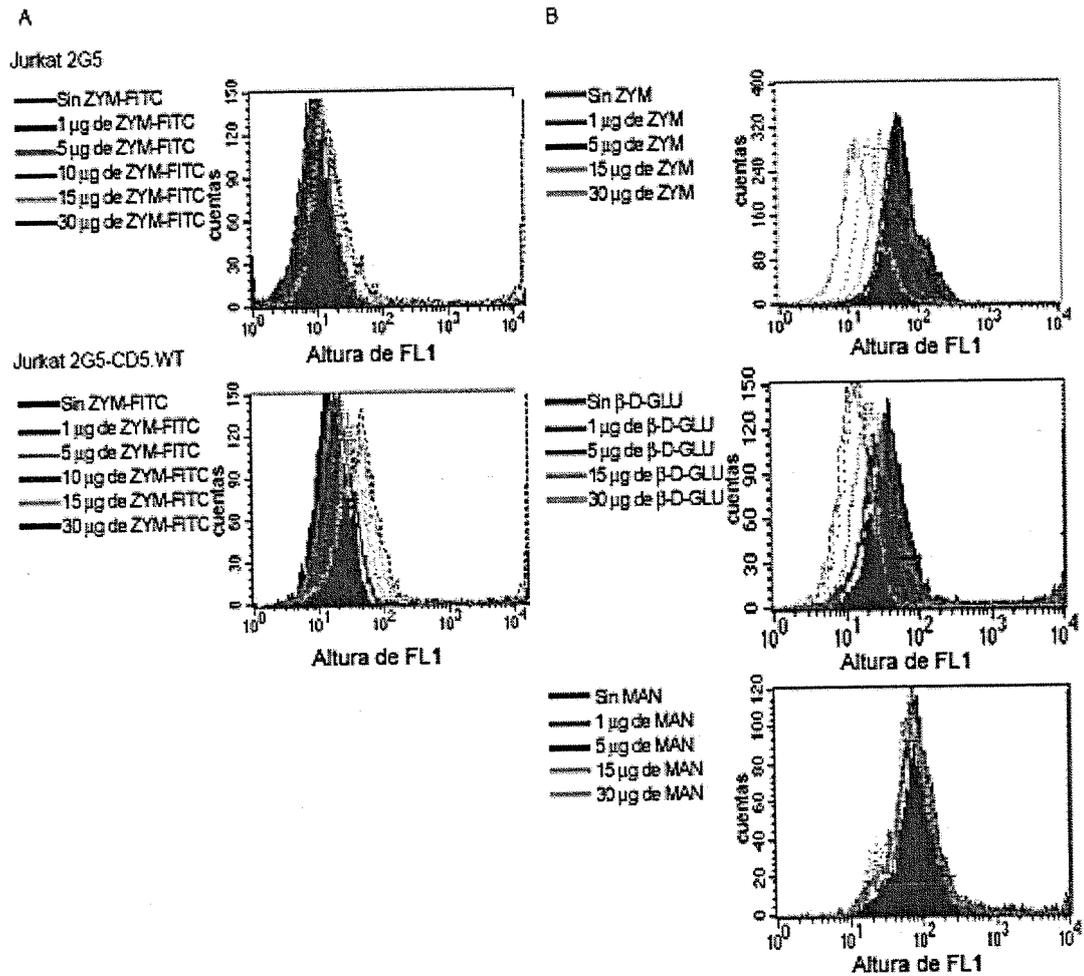
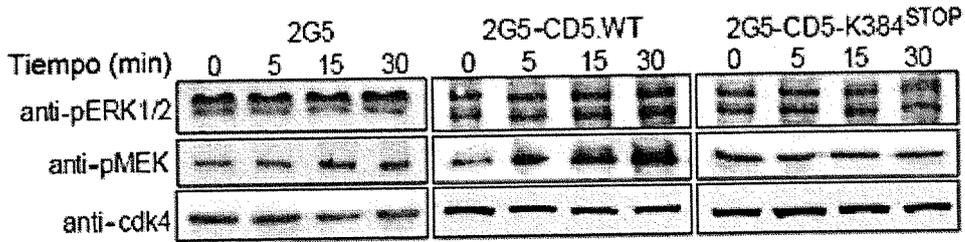
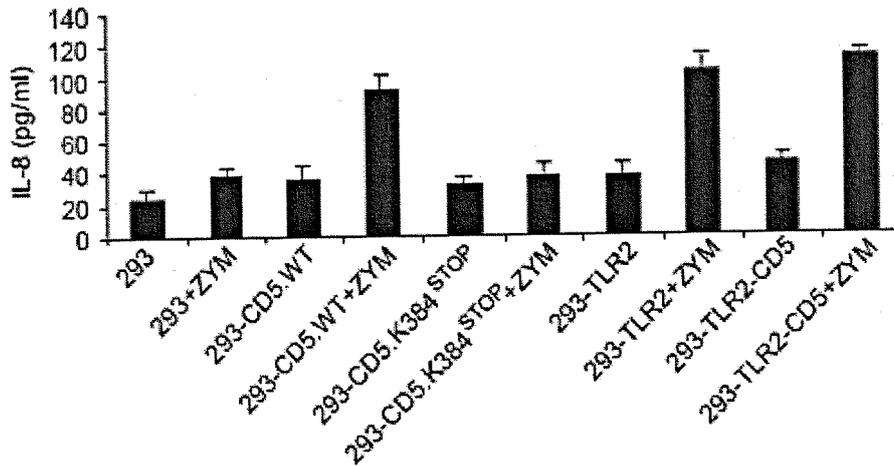


FIGURA 5

A



B



C

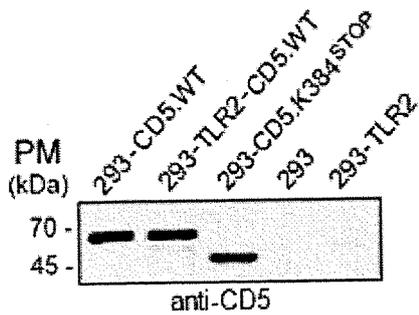


FIGURA 6

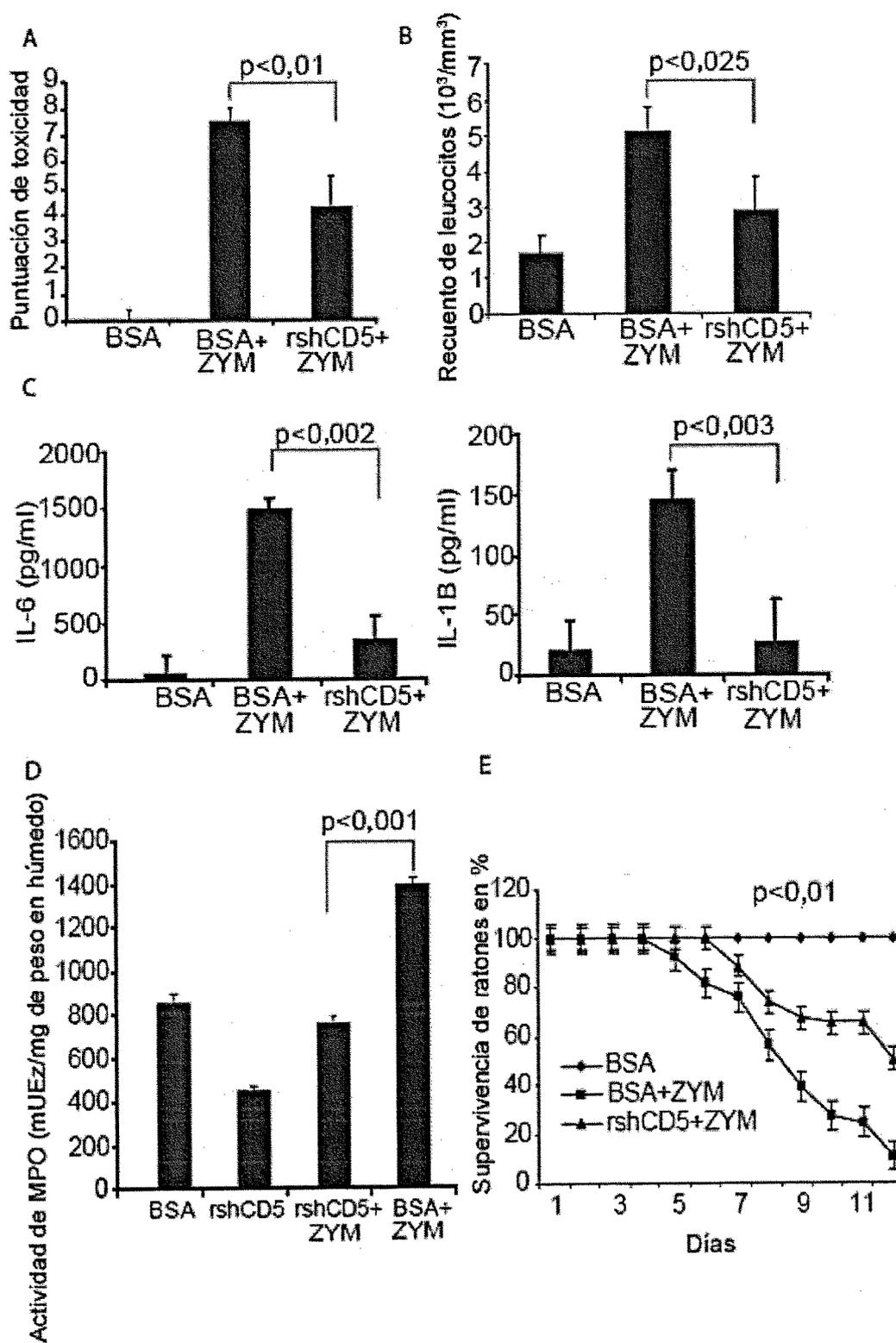


FIGURA 7



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 336 752

② Nº de solicitud: 200801860

③ Fecha de presentación de la solicitud: 20.06.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 38/17** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X A	CALVO JAVIER et al. "Interaction of recombinant and natural soluble CD5 forms with an alternative cell surface ligand" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 29, no. 7, Julio 1999, páginas 2119-2129, página 2120, figura 1; páginas 2125- 2126. Resumen.	1-4,9-14 5-8
X A	CALVO J. et al. "Identification of a natural soluble form of human CD5" TISSUE ANTIGENS, MUNKSGAARD, COPENHAGEN, DK, vol. 54, nº 2, agosto 1999, páginas 128-137, página 130, figura 1; páginas 134-135. Resumen.	1-4,9-14 5-8
A	LEVITZ STUART M. et al. "Phenotypic and functional characterization of human lymphocytes activated by interleukin-2 to directly inhibit growth of Cryptococcus neoformans in vitro" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 91, nº 4, 1993, páginas 1490-1498, todo el documento.	1-18
A	SARRIAS MARIA-ROSA et al. "CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns and protects from LPS-induced septic shock" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 104, nº 28, julio 2007, páginas 11724-11729, todo el documento.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

26.03.2010

Examinador

S. González Peñalba

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.03.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	5-8, 15-18	SÍ
	Reivindicaciones	1-4	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	5-8, 15-18	SÍ
	Reivindicaciones	9-14	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Interaction of recombinant and natural soluble DC5	1999
D02	Identification of a natural soluble form of human CD5	1999
D03	Phenotypic and functional characterization of human lymphocytes	1993
D04	CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns	2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente se refiere a una composición farmacéutica que comprende el ectodominio soluble CD5 y a su empleo en la prevención y/o tratamiento de infecciones fúngicas y/o septicemia fúngica, así como trastornos inflamatorios desencadenados por componentes fúngicos.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA. LP ARTS. 6 Y 8

El documento D01 hace referencia a las propiedades de unión celular del dominio extracelular CD5 humano soluble recombinante (rsCD5). El procedimiento de obtención de dicho dominio extracelular de CD5 que consiste en amplificación del ectodominio por PCR usando cebadores, clonación del fragmento amplificado en un vector de expresión y expresión y purificación del ectodominio soluble recombinante humano se encuentra recogido en dicho documento.

El documento D02 describe la identificación de la forma soluble natural del CD5 humano, que pertenece a la familia de receptores de tipo scavenger (SRGR). Se ha purificado y caracterizado dicha forma que es indistinguible (en apariencia, en masa molecular, en patrones de glicosidación y en reactividad de anticuerpos) de la forma recombinante soluble de CD5.

El documento D03 demuestra que la fracción no adherente de PBMC humano puede ser activada por IL-2 para inhibir el crecimiento de *Cryptococcus neoformans*. Las células T y NK activadas por IL-2 forman conjugados que inhiben directamente el crecimiento de *C. neoformans*. Por lo tanto, demuestran que las células T humanas inhiben directamente el crecimiento de agentes microbianos.

El documento D04 trata del estudio de las capacidades de unión a bacterias de los ectodominios de receptores CD5 y CD6 de linfocitos humanos, poniendo de manifiesto que los receptores CD6 son capaces de unirse a estructuras conservadas de bacterias como son LPS y LTA (página 11727).

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados (D01-D04), las reivindicaciones 1-4 sobre la composición farmacéutica que comprende el ectodominio soluble de CD5 carecen de novedad y actividad inventiva por encontrarse dicha composición ya recogida en el estado de la técnica. En cuanto a las reivindicaciones 9-14 sobre el procedimiento para obtener el ectodominio DI y DII carecen de actividad inventiva porque el procedimiento de amplificación por PCR usando cebadores, clonación del fragmento amplificado en un vector de expresión y expresión y purificación son pasos que resultan evidentes para un experto en la materia en relación con el estado de la técnica (independientemente del vector de expresión empleado y del tipo de células utilizadas).