



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 372 103**

② Número de solicitud: 200900908

⑤ Int. Cl.:

C07K 14/40 (2006.01)

A61K 36/064 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **02.04.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2012**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.01.2012

⑦ Solicitante/s: **Universidad del País Vasco
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa, Bizkaia, ES**

⑦ Inventor/es: **Hernando Echevarría, Fernando y
Ramírez García, Andoni**

⑦ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤ Título: **Compuestos estimuladores de la adhesión celular indeseada y sus aplicaciones.**

⑤ Resumen:

Compuestos estimuladores de la adhesión celular indeseada y sus aplicaciones.

Se describen unas proteínas no glicosiladas, basadas en la proteína Kre9 de *Candida albicans*, con capacidad para estimular la adhesión celular y su empleo en la identificación de compuestos potencialmente útiles contra enfermedades asociadas con una adhesión celular indeseada. La invención también se relaciona con el empleo de dichas proteínas no glicosiladas en el tratamiento de enfermedades causadas por agentes infecciosos.

DESCRIPCIÓN

Compuestos estimuladores de la adhesión celular indeseada y sus aplicaciones.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona, en general, con la identificación de unas proteínas no glicosiladas con capacidad para estimular la adhesión celular y su empleo en la identificación de compuestos potencialmente útiles contra enfermedades asociadas con una adhesión celular indeseada. La invención también se relaciona con el empleo de dichas proteínas no glicosiladas en el tratamiento de enfermedades causadas por agentes infecciosos.

Antecedentes de la invención

La metástasis es el mecanismo celular por el cual se produce el traslado de células desprendidas de un tumor maligno, desde su lugar de generación hasta otro sin conexión anatómica directa, donde se reimplantan. Su producción implica un complejo proceso integrado por una sucesión de etapas interdependientes, en donde las células tumorales logran colonizar otros territorios orgánicos tras diseminarse a través de cavidades internas o del torrente vascular linfático y/o sanguíneo. Una vez establecidas como metástasis, parasitan el territorio invadido, donde producen efectos dañinos diversos desde mecánicos hasta endocrinos.

Las etapas más comúnmente aceptadas para explicar el proceso metastático son:

- a) *desprendimiento y movilización de las células tumorales*: dependiendo de la localización del tumor primario, las células tumorales tienen distinta capacidad para despegarse y abandonar el foco tumoral; a continuación, las células desprendidas deben alcanzar los vasos sanguíneos o linfáticos para poder diseminarse hacia otros órganos alejados;
- b) *diseminación de las células tumorales*: las células que acceden al torrente circulatorio, además de tener que adaptarse a las diferentes condiciones medioambientales de la sangre y a los efectos mecánicos causados por la hemodinámica circulatoria, tienen que escapar del efecto tumoricida del sistema inmune;
- c) *implantación de las células metastásicas en órganos a distancia*: en esta etapa del proceso metastático se han descrito tres fenómenos consecutivos: la parada de las células tumorales circulantes en la luz capilar, la extravasación en el tejido circundante y la proliferación hasta formar la metástasis; y
- d) *proliferación clonogénica y formación de metástasis* una vez extravasadas, la proliferación de las células metastásicas es diferente a la que se observa en el tumor primario, las células tumorales tienen una autorregulación condicionada por sus propios factores de crecimiento y sus oncogenes.

La existencia sobre la superficie celular de receptores para moléculas de la matriz extracelular podría ser de vital importancia para asegurar la perfecta fijación y posterior proliferación de la célula tumoral. La interacción entre las células tumorales circulantes y las células endoteliales es uno de los procesos que determina que la metástasis sea órgano-específica. En el proceso de adhesión entre la tumoral y el endotelio vascular intervienen moléculas de adhesión que son expresadas, tanto por la célula tumoral como la célula endotelial. Este hecho sugiere que el potencial metastático de cada célula tumoral pueda estar influenciado por el tipo de moléculas de adhesión que son expresadas durante la interacción entre la célula cancerosa y el endotelio vascular, de ahí que la identificación de esas moléculas se considere como uno de los objetivos primordiales para el tratamiento y la prevención de la diseminación tumoral.

Aunque la adhesión específica de las células tumorales al endotelio microvascular es un hecho contrastado, todavía no se conoce su implicación en el desarrollo de las metástasis. Se ha sugerido que las células adheridas al endotelio podrían estar más protegidas al ataque de las células citotóxicas circulantes y tener, consecuentemente, más posibilidades de prolongar su vida media que permaneciendo en el torrente sanguíneo. La adhesión tumoral al endotelio también puede facilitar la motilidad celular necesaria para su extravasación y contribuir a otra etapa del proceso metastático, la invasión tumoral del parénquima. También se ha propuesto que durante el proceso metastático, el principal valor de la adhesión tumoral al endotelio corresponde a la transducción de señales de este último a las células tumorales viables, lo cual serviría como estímulo para la proliferación intravascular en los lugares de la detención. En pulmón, se ha observado que la proliferación de las células tumorales que se adhieren al endotelio origina la formación de micrometástasis intravasculares sin necesidad de extravasación, que aumentan el tamaño rompiendo la pared vascular. Diversos estudios morfológicos de la adhesión tumoral al endotelio han indicado que la adhesión tiene lugar preferentemente en la zona de unión entre células endoteliales vecinas. Se ha observado que este proceso se continúa con una retracción endotelial y la recanalización del vaso sanguíneo alrededor de las células tumorales. La retracción endotelial conlleva la exposición de la membrana basal y promueve la adhesión tumoral a la matriz extracelular. Una estimulación simultánea de la síntesis y secreción de enzimas proteolíticas por las células endoteliales podría, a su vez, favorecer este proceso. En este sentido, demostraron que el endotelio dañado por la acción de radicales libres de oxígeno, libera colagenasas activas capaces de degenerar la membrana basal y facilitar la invasión tumoral. Por último, en relación con las implicaciones funcionales de la adhesión tumoral al endotelio, cabe destacar el papel citotóxico de las células

endoteliales sobre las células tumorales. Esta citotoxicidad requiere un contacto directo entre las células tumorales y el endotelio.

La prevención y el control terapéutico de la metástasis es muy difícil. La principal razón del fracaso médico radica en la inexistencia de una información precisa sobre su patogénesis, lo cual conlleva una falta de recursos específicos para su profilaxis o inhibición.

Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar alternativas a las existentes para prevenir y controlar la metástasis que contribuyan a incrementar el arsenal de remedios terapéuticos frente a dicha situación patológica.

Compendio de la invención

Los inventores de la presente invención han encontrado que la proteína Kre9, no glicosilada, de *C. albicans*, está implicada en el aumento de la adhesión de células tumorales de melanoma al endotelio sinusoidal hepático induciendo de ese modo un proceso metastático en hígado. En base a este hecho, los inventores han abierto una nueva ventana terapéutica para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades asociadas a una adhesión celular indeseada, tales como, por ejemplo, procesos tumorales, procesos metastáticos, enfermedades que provoquen una respuesta inmune celular, o procesos inflamatorios, en particular, mediados por citocinas. Asimismo, dicha proteína puede ser utilizada, debido a su alto potencial proinflamatorio, en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades causadas por agentes infecciosos.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con una proteína, no glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento de la misma con capacidad estimuladora de la adhesión tumoral al endotelio, y con su empleo en la identificación de compuestos potencialmente útiles contra enfermedades asociadas con una adhesión celular indeseada y en el tratamiento de dichas enfermedades.

Por otra parte, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dicha proteína, no glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, como antígeno en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso, e.g., candidiasis.

La invención también se relaciona con el empleo de una proteína, glicosilada, con capacidad de estimular la adhesión tumoral al endotelio, que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento de la misma que mantiene dicha capacidad estimuladora de la adhesión tumoral al endotelio, en la identificación de compuestos potencialmente útiles contra enfermedades asociadas con una adhesión celular indeseada.

Breve descripción de las figuras

En la Figura 1 se muestra A: Plásmido pET-Blue circular; B: Plásmido pET-Blue lineal, digerido con uno de los enzimas de restricción; C: Plásmido pET-KRE9 circular; D: Plásmido pET-KRE9 lineal digerido con uno de los enzimas de restricción; E: Plásmido pET-KRE9 digerido con los 2 enzimas de restricción; y F: Producto de amplificación mediante PCR del gen KRE9. Para información adicional véase el Ejemplo 1.

La Figura 2 muestra los resultados de A: Electroforesis en SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie del extracto proteico de *E. coli* tras ser inducida la expresión de la proteína CaKre9 antes de purificar; B: Western Blot del extracto de *E. coli* + CaKre9 antes de purificar evaluado frente al anticuerpo anti-HSV; C: Electroforesis en SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie del extracto proteico de *E. coli* tras ser inducida la expresión de la proteína CaKre9 después de ser purificada; D: Western Blot de la proteína CaKre9 recombinante después de ser purificada evaluado frente al anticuerpo anti-HSV; y E: Western Blot de la proteína CaKre9 recombinante después de ser purificada evaluado frente al anticuerpo anti-IL-1 β .

La Figura 3 es un diagrama de barras donde puede apreciarse el efecto de la proteína de fusión CaKre9-(His)₆ sobre el aumento de la adhesión tumoral al ESH. Las diferencias se expresan como adhesión relativa de células del B16M al ESH. El asterisco (*) indica que las diferencias son significativas.

La Figura 4 muestra la secuencia del gen KRE9 de *C. albicans* (negrita cursiva) y de las secuencias utilizadas como cebadores (subrayado). Dicha secuencia se incluye en la Lista de Secuencias identificada como SEQ ID NO: 5.

Descripción detallada de la invención

I. Proteína no glicosilada de la invención, su obtención y aplicaciones

En un aspecto, la invención se relaciona con una proteína, no glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio.

ES 2 372 103 A1

Por razones de simplicidad, bajo la denominación “*proteína no glicosilada de la invención*” se incluye dicha proteína, no glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO: 1, así como las variantes y fragmentos funcionalmente equivalentes de la misma con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio.

En una realización particular, la proteína no glicosilada de la invención comprende, o está constituida por, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; dicha proteína presenta, al menos, la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, capacidad que puede ser determinada poniendo en contacto células tumorales con células endoteliales estimuladas con dicha proteína no glicosilada de la invención (véase, por ejemplo, el Ejemplo 2).

En una realización particular, la proteína no glicosilada de la invención es la proteína Kre9, no glicosilada, de una especie del género *Candida* (*Candida* spp.), por ejemplo, la proteína Kre9 no glicosilada de *C. albicans*. El término “*C. albicans*”, tal como se utiliza en la presente invención, incluye cualquier cepa de *Candida albicans*, un hongo diploide asexual (forma de levadura), saprofito de la familia de los Sacaromicetos.

En una realización concreta, la proteína no glicosilada de la invención es la proteína Kre9, no glicosilada, de *C. albicans* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 [Accesión: XM_717838; Versión: XM_717838.1, GI: 68465725; organismo *C. albicans* SC5314]. En otra realización concreta, la proteína no glicosilada de la invención es la proteína Kre9, no glicosilada, de *C. albicans* que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en US 6.582.911 B1 (en concreto en la SEQ ID NO: 2 incluida en dicha patente norteamericana).

El gen KRE9 de *C. albicans* codifica una proteína (Kre9) similar al producto del gen KRE9 de *Saccharomyces cerevisiae*. Su secuencia consta de un marco de lectura abierto (ORF) de 813 pares de bases (pb) que codifica una proteína de 29 kDa formada por 271 aminoácidos. La región hidrofóbica N-terminal es una secuencia señal aproximadamente hasta el punto de unión entre el aminoácido 21 y 22. La proteína Kre9 de *C. albicans* contiene una zona central rica en residuos de serina y treonina característicos de una potencial O-glicosilación, típica de muchas manoproteínas de pared. La disrupción del gen KRE9 de *C. albicans* pone de manifiesto que dicha proteína Kre9 es requerida para la síntesis o ensamblaje de los β -1,6-glucanos (Lussier *et al.*, Proc Natl Acad Sci. 1998; 95:9825-9830). Las células imitantes homocigotas de *C. albicans* para el gen KRE9 crecen pobremente en galactosa y no son capaces de filamentar en suero y en medios que contienen glucosa el gen resulta esencial. El Ejemplo 2 ilustra la capacidad de una proteína Kre9 de *C. albicans* (CaKre9) recombinante expresada en *Escherichia coli* y, por tanto, no glicosilada, de aumentar significativamente la adhesión de células tumorales (células de melanoma MB16) al endotelio sinusoidal hepático (ESH).

En otra realización particular, la proteína no glicosilada de la invención comprende, o está constituida por, una variante, no glicosilada, de dicha proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y que presenta, al menos, la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio. En el sentido utilizado en esta descripción, el término “variante” se refiere a un péptido (o proteína) sustancialmente homólogo y funcionalmente equivalente a dicha proteína que comprende la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO: 1.

Tal como aquí se utiliza, un péptido es “sustancialmente homólogo” a dicha proteína cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos de dicha proteína, de, al menos, un 60%, ventajosamente de, al menos un 70%, preferentemente de, al menos, un 85%, y, más preferentemente de, al menos, un 95%. Secuencias homologas a una secuencia de una proteína pueden ser identificadas fácilmente por un experto en la materia con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias, por ejemplo, el programa BLAST (Altschul *et al.* 1997. Nucleic Acids Res. 25:3389).

Asimismo, la expresión “funcionalmente equivalente”, tal como aquí se utiliza, significa que el péptido en cuestión mantiene la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio. La capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio se puede determinar mediante cualquier ensayo apropiado conocido por los expertos en la materia; por ejemplo, poniendo en contacto células tumorales con células endoteliales estimuladas con dicha proteína no glicosilada de la invención; para ello, dicha proteína no glicosilada de la invención se une al receptor apropiado y lo activa estimulando la adhesión tumoral al endotelio. En una realización particular, la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio puede determinarse mediante un ensayo como el descrito en el Ejemplo 2.

En una realización concreta, dicha variante es una forma mutante de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 que mantiene la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio. Dicha forma mutante puede presentar inserciones, deleciones o modificaciones de uno o más aminoácidos respecto a la proteína que comprende la SEQ ID NO: 1, con la condición de que conserve la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio.

Asimismo, en el sentido utilizado en esta descripción, el término “fragmento” se refiere a un péptido que comprende una porción de dicha proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, es decir, una secuencia de aminoácidos contiguos comprendida dentro de dicha SEQ ID NO: 1; para su empleo en la presente invención dicho fragmento debe ser funcionalmente equivalente, es decir, el fragmento (péptido) en cuestión mantiene la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio.

Como se ha mencionado previamente, la proteína no glicosilada de la invención presenta, al menos, la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, capacidad que puede ser determinada poniendo en contacto células tumorales con células endoteliales estimuladas con dicha proteína no glicosilada de la invención mediante la unión o interacción de dicha proteína no glicosilada de la invención con el receptor apropiado, cuya activación parece estimular la adhesión tumoral al endotelio. Además, la proteína no glicosilada de la invención puede presentar la capacidad de unirse a un receptor apropiado, tal como un receptor de una citocina (mimetizando de ese modo a la citocina correspondiente) o un receptor al que se une o con el que interactúa la proteína Kre9 de *C. albicans*; algunos de dichos receptores pueden estimular la adhesión celular al endotelio. En una realización particular, el receptor al que se une la proteína no glicosilada de la invención es un receptor de una citocina, tal como el receptor de la interleucina-1beta (IL-1 β), por lo que dicha proteína no glicosilada de la invención puede actuar mimetizando dicha citocina (IL-1 β). Por tanto, la proteína no glicosilada de la invención puede ser utilizada en la identificación de compuestos potencialmente útiles en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades asociadas con una adhesión celular indeseada. Asimismo, la proteína no glicosilada de la invención puede presentar la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria, y, por tanto, debido a su potencial proinflamatorio, actuar como antígeno, por lo que podría ser utilizada en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso.

La proteína no glicosilada de la invención se puede obtener a partir de un organismo productor de la proteína glicosilada y sometiendo a dicha proteína glicosilada a un tratamiento para eliminar los carbohidratos, por ejemplo, mediante oxidación química (e.g., tratamiento con metaperiodato, etc.). Alternativamente, la proteína no glicosilada de la invención se puede obtener a partir de un organismo productor de dicha proteína no glicosilada, mediante un procedimiento que comprende cultivar dicho organismo bajo condiciones apropiadas para la expresión de dicha proteína y recuperarla. En una realización particular de esta invención, el organismo productor de la proteína no glicosilada de la invención es un organismo procariota que comprende un polinucleótido que codifica la proteína no glicosilada de la invención; en una realización particular, dicho organismo es una bacteria, e.g., *Escherichia coli*. En el Ejemplo 1 se describe la producción, aislamiento y purificación de una proteína no glicosilada de la invención, concretamente, de la proteína Kre9 de *C. albicans* recombinante (proteína CaKre9 recombinante) que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 (o una variante de la misma) fusionada a una cola de HSV y 6 restos de histidina [(His)₆], con capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio.

Por tanto, alternativamente, la proteína no glicosilada de la invención puede formar parte de una proteína de fusión. En este sentido, a modo ilustrativo, no limitativo, dicha proteína de fusión puede contener una región A constituida por un primer péptido que comprende la proteína no glicosilada de la invención unida a una región B que comprende un segundo péptido. Dicho segundo péptido puede ser cualquier péptido apropiado, por ejemplo, un péptido útil para identificar la proteína recombinante, por ejemplo, mediante inmunodetección de la proteína recombinante (e.g., una cola HSV, o cualquier otra cola similar susceptible de ser reconocida, por ejemplo, por un anticuerpo, etc.) y/o para purificar la proteína recombinante, por ejemplo, una cola de histidinas, que permite la purificación de la proteína recombinante mediante el empleo de una columna de afinidad. Dicha región B puede estar unida a la región aminoterminal de dicha región A, o bien, alternativamente, dicha región B puede estar unida a la región carboxilo-terminal de dicha región A. Ambas regiones A y B pueden estar unidas directamente o a través de un péptido espaciador (linker) entre dichas regiones A y B. La proteína de fusión puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante la expresión génica de la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión en células hospedadoras apropiadas.

La proteína no glicosilada de la invención puede encontrarse, si se desea, en una composición que comprende dicha proteína no glicosilada de la invención y un vehículo inerte. Dicha composición constituye un aspecto adicional de esta invención. Prácticamente cualquier vehículo inerte, es decir, que no resulte perjudicial para la proteína no glicosilada de la invención, puede ser utilizada en la elaboración de dicha composición.

A partir de la información proporcionada por la proteína no glicosilada de la invención, se puede identificar y aislar la secuencia de ácido nucleico que codifica para dicha proteína mediante el empleo de técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante la creación de genotecas de DNA genómico (DNAG) o de DNA copia (cDNA) de organismos productores de dicha proteína; el diseño de oligonucleótidos adecuados para amplificar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una región del clon genómico de los organismos productores de dicha proteína que sirva para obtener sondas destinadas a escrutar dichas genotecas; y el análisis y selección de los clones positivos. En una realización particular, se ha diseñado una pareja de oligonucleótidos iniciadores constituida por los oligonucleótidos cuyas secuencias se muestran en SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO: 4, para amplificar el gen que codifica para la proteína Kre9 de *C. albicans*. Dichos oligonucleótidos iniciadores constituyen un aspecto adicional de esta invención.

En una realización particular, el polinucleótido que codifica para la proteína no glicosilada de la invención comprende, o está constituido por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En una realización concreta, el polinucleótido que codifica para la proteína Kre9, no glicosilada, de *C. albicans* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 [Accesión: XM_717838; Versión: XM_717838.1, GI: 68465725; organismo *C. albicans* SC5314], En otra realización concreta, el polinucleótido que codifica para la proteína Kre9, no glicosilada, de *C. albicans* tiene la secuencia de nucleótidos descrita en US 6.582.911 B1 (en concreto en la SEQ ID NO: 1 incluida en dicha patente norteamericana).

Alternativamente, el polinucleótido que codifica para la proteína no glicosilada de la invención puede presentar variaciones en su secuencia respecto a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, por ejemplo, sustituciones, inserciones y/o deleciones de uno o más nucleótidos, con la condición de que el polinucleótido resultante codifica para una proteína no glicosilada de la invención. Por tanto, dentro del ámbito de la presente invención se encuentran polinucleótidos sustancialmente homólogos al polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos se muestra en la SEQ ID NO: 2 y codifica para una proteína no glicosilada de la invención.

En el sentido utilizado en esta descripción, un polinucleótido es “sustancialmente homólogo” al polinucleótido de SEQ ID NO: 2 cuando su secuencia de nucleótidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 de, al menos, un 60%, ventajosamente de, al menos un 70%, preferentemente de, al menos, un 85%, y, más preferentemente de, al menos, un 95%. Típicamente un polinucleótido sustancialmente homólogo al polinucleótido de SEQ ID NO: 2 se puede aislar de un organismo productor de la proteína glicosilada/no glicosilada de la invención en base a la información contenida en dicha SEQ ID NO: 2, o bien se construye en base a la secuencia de DNA mostrada en la SEQ ID NO: 2, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones conservativas o no conservativas. Otros ejemplos de posibles modificaciones incluyen la inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la secuencia, o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia.

Dicho polinucleótido que codifica para la proteína no glicosilada de la invención puede estar contenido en una construcción génica que comprende dicho polinucleótido. Dicha construcción génica puede incorporar, operativamente unida, una secuencia reguladora de la expresión de dicho polinucleótido que codifica para la proteína no glicosilada de la invención, constituyendo de este modo un cassette de expresión. Tal como se utiliza en esta descripción, la expresión “operativamente unida” significa que la proteína no glicosilada de la invención, codificada por dicho polinucleótido, es expresada en el marco de lectura correcto bajo el control de las secuencias de control o reguladoras de expresión. Las secuencias de control son secuencias que controlan y regulan la transcripción y, en su caso, la traducción de la proteína de la invención, e incluyen secuencias promotoras, secuencias codificantes para reguladores transcripcionales, secuencias de unión a ribosomas (RBS) y/o secuencias terminadoras de transcripción. En una realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en organismos procariotas, por ejemplo, bacterias, etc., tal como *E. coli* o similares. Ventajosamente, la construcción comprende, además, un marcador o gen que codifica para un motivo o para un fenotipo que permita la selección del organismo transformado con dicha construcción. Dicha construcción génica puede obtenerse mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica (Sambrook *et al.*, “Molecular cloning, a Laboratory Manual”, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3).

Asimismo, dicha construcción génica puede ser insertada en un vector apropiado. La elección del vector dependerá del organismo hospedador en el que se va a introducir posteriormente dicho vector. En una realización particular, el vector es un plásmido (pETKRE9) procedente de un plásmido comercial pET-Blue (Ejemplo 1). Dicho vector puede ser obtenido por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook *et al.*, citado *supra*). En una realización particular, dicho vector es un vector útil para transformar bacterias, e.g., *E. coli* competentes.

Dicho vector puede ser utilizado para transformar organismos susceptibles de ser transformados por dicho vector. Dichos organismos, dado que la proteína a expresar (proteína no glicosilada de la invención) no debe estar glicosilada, son organismos procariotas, por ejemplo, bacterias, tales como *E. coli*, etc., e.g., *E. coli* BL21(DE3) (Studier y Moffatt (1986) J. Mol. Biol. 189: 113-130), etc.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un organismo procariota, en adelante “organismo procariota de la invención”, transformado con el vector previamente mencionado; por tanto, el organismo procariota de la invención comprende, por tanto, un polinucleótido que codifica para una proteína no glicosilada de la invención, o una construcción génica que comprende dicho polinucleótido, o un cassette de expresión que comprende dicho polinucleótido, o bien un vector que comprende dicho polinucleótido, y es capaz de expresar la proteína no glicosilada de la invención. Como se ha mencionado previamente, dicho organismo procariota de la invención es una bacteria, por ejemplo, *E. coli*, etc., tal como *E. coli* BL21(DE3), etc. El organismo procariota de la invención puede ser obtenido por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia [Sambrook *et al.*, 1989, citado *supra*].

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de una proteína no glicosilada de la invención, que comprende cultivar un organismo procariota de la invención bajo condiciones que permiten la producción de dicha proteína y, si se desea, recuperar dicha proteína no glicosilada de la invención del medio de cultivo. Las condiciones para optimizar el cultivo de dicho organismo procariota de la invención dependerá del organismo procariota utilizado; dichas condiciones son conocidas por los expertos en la materia. El procedimiento para producir la proteína no glicosilada de la invención incluye, opcionalmente, el aislamiento y purificación de dicha proteína no glicosilada de la invención.

Como se ha mencionado previamente, la proteína no glicosilada de la invención tiene la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio y la capacidad de unirse a un receptor apropiado, tal como un receptor de una citocina (mimetizando de ese modo a la citocina correspondiente) o un receptor al que se une o con el que interactúa la proteína Kre9 de *C. albicans*, por ejemplo, receptores que pueden estimular la adhesión celular al endotelio, tal como, el receptor de la IL-1 β , por lo que dicha proteína no glicosilada de la invención puede actuar mimetizando dicha citocina (IL-1 β). Por tanto, la proteína no glicosilada de la invención puede ser utilizada en la identificación de

compuestos potencialmente útiles en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada con una adhesión celular indeseada.

5 En el contexto de la presente invención, una “enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada” incluye la progresión y la metástasis de cáncer y tumores. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de enfermedades asociadas a una adhesión celular indeseada y que pueden ser tratados de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluyen cáncer, metástasis, restenosis, enfermedades que provocan una respuesta inmune celular y enfermedades inflamatorias.

10 En una realización particular de la invención, la enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada es un cáncer o un proceso tumoral o canceroso, es decir, una condición fisiológica en mamíferos caracterizada por un crecimiento celular desregulado.

15 En otra realización particular de la invención, la enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada es una metástasis o proceso metastático, es decir, la propagación de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició, por ejemplo, por vía sanguínea o linfática. En una realización particular, dicho proceso metastático conduce a la implantación de un tumor en el hígado, por ejemplo, en el ESH.

20 En otra realización particular de la invención, la enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada es una restenosis, es decir, una enfermedad que cursa con una migración excesiva de células como resultado de la liberación de factores de crecimiento producidos por un daño mecánico de las células endoteliales que constituyen las arterias coronarias.

25 En otra realización particular de la invención, la enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada es una enfermedad que provoca una respuesta inmune celular, es decir, una forma de respuesta inmunológica adaptativa mediada por linfocitos T que actúa como mecanismo de defensa en contra de microorganismos intracelulares, e.g., virus, algunas bacterias y hongos, capaces de sobrevivir y proliferar en el interior de los fagocitos y otras células del huésped, lugar al que no tienen acceso los anticuerpos circulantes, etc. La defensa frente a este tipo de infecciones depende de la inmunidad celular, que induce la destrucción del microorganismo residente en los fagocitos o de las células infectadas.

30 En otra realización particular de la invención, la enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada es una enfermedad inflamatoria o proceso inflamatorio, en particular, un proceso inflamatorio mediado por citocinas, es decir, una enfermedad que provoca inflamación como consecuencia de una proliferación celular asociada con una disfunción proliferativa, e.g., glomerulonefritis proliferativa, lupus eritematoso, escleroderma, artritis temporal, tromboangitis, síndrome del nódulo linfático muco-cutáneo, etc.

Identificación de compuestos potencialmente terapéuticos

40 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para identificar un compuesto potencialmente útil para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada, en adelante *método de identificación (I) de compuestos potencialmente terapéuticos de la invención*, que comprende:

- 45 a) poner en contacto una célula que expresa un receptor al que se une, o con el que interactúa, una proteína no glicosilada de la invención con una proteína no glicosilada de la invención y con el compuesto candidato, y
- b) identificar aquellos compuestos que inhiben la unión de dicha proteína no glicosilada de la invención a dicho receptor.

50

55 En una realización particular, el método de identificación de compuestos potencialmente terapéuticos de la invención es particularmente útil y resulta adecuado para identificar y seleccionar compuestos potencialmente útiles para la prevención y/o el tratamiento de procesos tumorales, procesos metastáticos, restenosis, enfermedades que provocan una respuesta inmune celular y/o enfermedades inflamatorias.

60 Aunque prácticamente cualquier célula que expresa un receptor al que se une, o con el que interactúa, una proteína no glicosilada de la invención puede ser utilizada en la puesta en práctica de dicho método, en una realización particular, dicha célula que expresa un receptor al que se une, o con el que interactúa, una proteína no glicosilada de la invención es una célula que expresa un receptor de una citocina, e.g., un receptor de la IL-1 β , o un receptor de cualquier otra citocina, o, en general, una célula que expresa un receptor al que se une la proteína Kre9 de *C. albicans*; así, en una realización particular, dicha célula que expresa un receptor al que se une, o con el que interactúa, una proteína no glicosilada de la invención es una célula del endotelio apropiada, por ejemplo, una célula del endotelio sinusoidal hepático (ESH).

65

Tratamiento y/o prevención de enfermedades asociadas a una adhesión celular indeseada

Los compuestos identificados según el método de identificación de compuestos potencialmente terapéuticos de la invención pueden ser utilizados en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un agente inhibidor de la actividad de la proteína no glicosilada de la invención para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada, tal como un proceso tumoral, un proceso metastático, restenosis, una enfermedad que provoca una respuesta inmune celular y/o una enfermedad inflamatoria. Es decir, en otras palabras, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un agente inhibidor de la actividad de la proteína no glicosilada de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada, tal como un proceso tumoral, un proceso metastático, restenosis, una enfermedad que provoca una respuesta inmune celular y/o una enfermedad inflamatoria.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada, tal como un proceso tumoral, un proceso metastático, restenosis, una enfermedad que provoca una respuesta inmune celular y/o una enfermedad inflamatoria, que comprende la administración a un sujeto en necesidad de tratamiento de un agente inhibidor de la actividad de una proteína no glicosilada de la invención (en ocasiones referido como “agente inhibidor (I) de la invención”), en una cantidad terapéuticamente eficaz.

El término “sujeto”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un miembro de una especie de mamífero, e incluye, pero no se limita a, animales domésticos, primates y humanos; preferentemente, el sujeto es un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza. En una realización particular, dicho sujeto en necesidad de tratamiento es un paciente con cáncer; en otra realización concreta, dicho sujeto en necesidad de tratamiento es un paciente con cáncer que, además, padece una enfermedad causada por un agente infeccioso, por ejemplo, una candidiasis.

En el contexto de la presente invención, el término “proteína no glicosilada de la invención” ya ha sido definido previamente. En una realización particular de la invención, la proteína no glicosilada de la invención comprende, o está constituida por, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o por la proteína Kre9, no glicosilada, de *Candida* spp., e.g., la proteína Kre9 no glicosilada de *C. albicans*, tal como la proteína Kre9, no glicosilada, de *C. albicans* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 de la patente norteamericana US 6.582.911 B1. En otra realización particular de la invención, la proteína no glicosilada de la invención es una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de las proteínas no glicosiladas previamente mencionadas.

En el contexto de la presente invención se entiende por “agente inhibidor (I) de la invención”, cualquier sustancia o compuesto que sea capaz de impedir o bloquear que la proteína no glicosilada de la invención realice su función (actividad), es decir, impedir que dicha proteína no glicosilada de la invención pueda activar/estimular la adhesión de células tumorales al endotelio. Aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría se cree que dicha actividad estimuladora de la adhesión tumoral al endotelio puede ser realizada mediante la activación de los receptores adecuados (e.g., el receptor de la IL-1 β , etc.) por parte de la proteína no glicosilada de la invención, por lo que la unión de un compuesto a dicha proteína no glicosilada de la invención puede dar como resultado que la proteína no glicosilada de la invención no se pueda unir a su receptor o receptores. Ensayos para determinar si un compuesto es un agente inhibidor de una proteína no glicosilada de la invención pueden ser diseñados por los expertos en la materia a la vista de la información proporcionada por esta invención, por ejemplo, a partir de la información contenida en el Ejemplo 2.

A modo ilustrativo, no limitativo, agentes inhibidores de la actividad de la proteína no glicosilada de la invención para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, péptidos inhibidores de dicha proteína no glicosilada de la invención, anticuerpos dirigidos específicamente contra epítomos de dicha proteína no glicosilada de la invención esenciales para desempeñar su función, etc. Por tanto, en una realización particular de la invención, dicho agente inhibidor (I) de la invención se selecciona del grupo formado por péptidos inhibidores y anticuerpos.

El término “péptido inhibidor”, tal como aquí se utiliza, hace referencia a aquellos péptidos capaces de unirse a una proteína no glicosilada de la invención e inhibir su actividad tal como se ha explicado anteriormente, es decir, impedir que la proteína no glicosilada de la invención pueda inducir o estimular la adhesión de células tumorales al endotelio.

Por “anticuerpo inhibidor” se entiende en el contexto de la presente invención todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse a una proteína no glicosilada de la invención, impidiendo que dicha proteína no glicosilada de la invención pueda inducir o estimular la adhesión de células tumorales al endotelio. Dichos anticuerpos pueden ser preparados usando cualquiera de los métodos que son conocidos para el experto en la materia. Así, los anticuerpos policlonales se preparan mediante inmunización de un animal con la proteína no glicosilada de la invención que se desea inhibir. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el método descrito por Köhler and Milstein (Nature, 1975; 256:495-397) o por Harlow and Lañe (“Using Antibodies. A Laboratory Manual” de E. Harlow y D. Lañe, Editor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; 1998 (ISBN 978-0879695439)). Una vez identificados anticuerpos con capacidad de unión a una proteína no glicosilada de la invención, se seleccionarán aquellos que son capaces de inhibir la actividad de dicha proteína usando el ensayo de identificación de agentes inhibidores al que se ha hecho referencia previamente.

En una realización particular, dicho anticuerpo inhibidor es un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína no glicosilada de la invención, tal como una proteína no glicosilada que comprende, o está constituida por, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o por la proteína Kre9, no glicosilada, de *Candida* spp., e.g., la proteína Kre9 no glicosilada de *C. albicans*, tal como la proteína Kre9, no glicosilada, de *C. albicans* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 de la patente norteamericana US 6.582.911 B1. En otra realización particular, dicho anticuerpo inhibidor es un anticuerpo que reconoce específicamente una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de las proteínas no glicosiladas previamente mencionadas. En una realización particular, dicho anticuerpo inhibidor es un anticuerpo que reconoce la IL-1 β , e.g., un anticuerpo anti-IL-1 β de mamífero.

En la presente invención, el término “anticuerpo” ha de ser interpretado de forma amplia e incluye anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos y fragmentos de los mismos (F(ab')₂, Fab), etc. siempre que sean capaces de reconocer específicamente el antígeno de interés, que en el contexto de la presente invención es una proteína no glicosilada de la invención. Ejemplos de anticuerpos que pueden emplearse en el contexto de a presente invención son, por ejemplo y sin limitación, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanos, etc.

Los anticuerpos policlonales son originalmente mezclas heterogéneas de moléculas de anticuerpos producidas en el suero de animales que han sido inmunizados con un antígeno. Incluyen también anticuerpos policlonales mono-específicos obtenidos a partir de las mezclas heterogéneas, por ejemplo, mediante cromatografía en una columna con péptidos de un único epítipo del antígeno de interés.

Un anticuerpo monoclonal es una población homogénea de anticuerpos específicos para un único epítipo del antígeno. Estos anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante técnicas convencionales ya descritas (véase más arriba).

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo monoclonal construido mediante clonación o recombinación de anticuerpos procedentes de distintas especies animales. En una configuración típica pero no limitativa de la invención, el anticuerpo quimérico incluye una parte de un anticuerpo monoclonal, generalmente la región variable (Fv) que incluye los sitios para reconocimiento y unión al antígeno, y la otra parte correspondiente a un anticuerpo humano, generalmente la parte que incluye la región constante y la constante adyacente.

Un anticuerpo totalmente humano es un anticuerpo o anticuerpos que han sido producidos en animales transgénicos con sistema inmune humano o por inmunización *in vitro* de células inmunes humanas (incluyendo tanto inmunización genética como tradicional con o sin adyuvantes y antígeno puro o no; o mediante cualquier método de exposición del antígeno al sistema inmune) o mediante bibliotecas nativas/sintéticas producidas desde células inmunes humanas. Estos anticuerpos pueden obtenerse y seleccionarse desde animales transgénicos (por ejemplo ratones) en los que se han clonado genes de las inmunoglobulinas humanas y que son inmunizados con el antígeno objetivo (en la presente invención dicho antígeno es una proteína no glicosilada de la invención). Estos anticuerpos pueden obtenerse por selección de regiones variables de cadena simple (scFv) o de unión al antígeno (Fab) humanas presentadas en bibliotecas de fagos (phage display) y posterior clonación e injerto en un anticuerpo humano o mediante cualquier otro método de producción y presentación (display) conocido por el experto en la materia, de las librerías generadas por clonación de las regiones variables de ambas cadenas y posterior combinación/mutación de éstas para generar librerías de anticuerpos.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo monoclonal construido mediante clonación e injerto de las regiones hipervariables determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal murino en un anticuerpo humano en sustitución de sus propias regiones hipervariables CDR.

Por otro lado, en el contexto de la presente invención, dentro del término “anticuerpo” también se incluyen variantes con un patrón de glicosilación alterado, así como fragmentos de anticuerpos, obtenidos a partir de la proteína o mediante tecnología recombinante, glicosilados o no glicosilados, que pueden consistir (i) en zonas variables de los anticuerpos unidas entre sí por un péptido de unión (scFv), (ii) en la zona variable junto a la constante CH1 de la cadena pesada (Fd) unida a la cadena ligera mediante cisteínas o mediante péptidos de unión y puente disulfuro (scFab), (iii) nuevas variantes, como cadenas pesadas solas, o (iv) cualquier modificación que se haga de los fragmentos de anticuerpo con el fin de hacerlos más afines, menos inmunogénicos (humanizados) o más estables en fluidos biológicos y que en el contexto de la presente invención, tengan capacidad de impedir que las proteínas no glicosiladas de la invención realicen su función (actividad), es decir, inducir o estimular la adhesión de células tumorales al endotelio.

El experto en la materia entenderá que los anticuerpos pueden obtenerse por medio de técnicas convencionales de ingeniería genética o recombinante, de producción de anticuerpos, de extracción y purificación a partir de fluidos o tejidos biológicos, o por cualquier otra técnica convencional para la obtención de proteínas y anticuerpos las cuales, son ampliamente conocidas por el experto en la materia. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de técnicas para la producción de anticuerpos son: técnicas de inmunización en animales, incluidos animales transgénicos para genes de inmunoglobulinas humanas, producción de monoclonales mediante hibridomas, producción mediante librerías de anticuerpos, que pueden ser nativas, sintéticas o derivadas de organismos inmunizados frente al antígeno de interés y que podrían ser seleccionadas mediante muy diferentes métodos de presentación o “display” (phage display, ribosome display, etc.) y posteriormente, mediante técnicas de ingeniería genética podrían ser rediseñadas y expresadas en

ES 2 372 103 A1

vectores diseñados para la producción de anticuerpos recombinantes de diferentes tamaños, composición y estructura. Una revisión de los principales métodos para la producción y purificación de los anticuerpos puede encontrarse, por ejemplo, en:

- 5 - "Handbook of Therapeutic Antibodies", de S. Dübel. Editor: Wiley-VCH, 2007, Vol: I a III (ISBN 978-3527314539);
- "Antibodies: Volume 1: Production and Purification" de G. Subramanian Ed., Editor: Springer, 1st Ed, 2004 (ISBN 978-0306482458);
- 10 - "Antibodies: Volume 2: Novel Technologies and Therapeutic Use", de G. Subramanian Ed., Editor: Springer, primera edición, 2004 (ISBN 978-0306483158); o
- 15 - "Molecular Cloning: a Laboratory manual", de J. Sambrook y D.W. Russel Eds., Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press, tercera edición, 2001 (ISBN 978-0879695774).

Tal como se ha expresado al comienzo de la descripción, los inventores de esta invención han abierto una nueva ventana terapéutica en el tratamiento de enfermedades asociadas a una adhesión celular indeseada, tales como procesos tumorales (cáncer), procesos metastáticos (metástasis), restenosis, enfermedades que provocan una respuesta inmune celular y/o enfermedades inflamatorias.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, en adelante "*composición farmacéutica A de la invención*", que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor (I) de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de enfermedades asociadas a una adhesión celular indeseada. Ejemplos de enfermedades asociadas a una adhesión celular indeseada incluyen procesos tumorales (cáncer), procesos metastáticos (metástasis), restenosis, enfermedades que provocan una respuesta inmune celular y/o enfermedades inflamatorias y han sido citadas previamente en la presente memoria.

En el contexto de la presente invención se entiende por "cantidad terapéuticamente eficaz" la cantidad de agente inhibidor (I) de la invención necesaria para conseguir el efecto deseado que, en este caso concreto, es el tratamiento de enfermedades asociadas a una adhesión celular indeseada. En general, la cantidad terapéuticamente efectiva del agente inhibidor (I) de la invención a administrar dependerá, entre otros factores, del sujeto que vaya a ser tratado, de la severidad de la enfermedad que padezca dicho sujeto, de la forma de administración elegida, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben ser consideradas tan solo como guías para el experto en la materia, y éste debe ajustar las dosis en función de las variables citadas anteriormente. No obstante, se puede administrar un agente inhibidor (I) de la invención, una o más veces al día, por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 veces al día, en una cantidad típica total diaria comprendida entre 0,1 y 1.000 mg/kg masa corporal/día, preferentemente 10 mg/kg masa corporal/día.

El término "tratamiento" o "tratar" en el contexto de esta descripción significa administración de un agente inhibidor (I) de la invención para prevenir, aliviar o curar la enfermedad, o uno o más síntomas asociados a dicha enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada. "Tratamiento" también abarca prevenir, aliviar o eliminar las secuelas fisiológicas de la enfermedad. El término "aliviar" en el contexto de esta invención se entiende como significando cualquier mejora de la situación del paciente tratado- tanto subjetivamente (sentimiento del o sobre el paciente) como objetivamente (parámetros medidos).

El término "transportador, adyuvante y/o vehículo" se refiere a entidades moleculares o sustancias con las que se administra el ingrediente activo (agente inhibidor (I) de la invención). Tales transportadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como aguas y aceites, incluyendo aquellas de petróleo o de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, excipientes, disgregantes, agentes humectantes o diluyentes. Se describen transportadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

En el contexto de la presente invención, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son tolerables fisiológicamente y no producen típicamente una reacción alérgica o una reacción desfavorable similar, tal como trastorno gástrico, mareo y similares, cuando se administran a un humano. Preferiblemente, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal o recogido en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales, y más particularmente en humanos.

El agente inhibidor (I) de la invención así como las composiciones farmacéuticas que los contienen, pueden ser utilizados junto con otros fármacos adicionales útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas a una proliferación y/o adhesión celular indeseada. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica A de la invención, o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición farmacéutica separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica A de la invención que comprende dicho agente inhibidor (I) de la actividad de una proteína no glicosilada de la invención.

Ejemplos de otros fármacos adicionales útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas a una proliferación celular indeseada son, pero no se limitan a, agentes alquilantes tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, carmustina, daunorubicina, mecloretamina, clorambucilo, nimustina, melfalán y similares; antraciclina, tales como, por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona, valrubicina y similares; compuestos de taxano, tales como, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel y similares; inhibidores de la topoisomerasa tales como, por ejemplo, etopóxido, tenipóxido, tulipóxido, irinotecán y similares; análogos de nucleótidos tales como, por ejemplo, azacitidina, azatioprina, capecitabina, citarabina, doxifluridina, fluorouracilo, gemcitabina, mercaptopurina, metotrexato, tioguanina, fltorafur y similares; agentes a base de platino tales como, por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatin y similares; agentes antineoplásicos tales como, por ejemplo, vincristina, leucovorina, lomustina, procarbazona y similares; moduladores hormonales tales como, por ejemplo, tamoxifeno, finasterida, inhibidores de la 5- α -reductasa y similares; alcaloides de la vinca tales como, por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina y similares. Los agentes quimioterápicos adecuados se describen con más detalle en la bibliografía, tal como en The Merck Index en CD-ROM, 13ª edición.

Inducción de una respuesta inflamatoria

Alternativamente, el agente inhibidor (I) de la invención así como las composiciones farmacéuticas que los contienen, pueden ser utilizados junto con otros fármacos adicionales útiles en el tratamiento de infecciones fúngicas, por ejemplo, agentes antifúngicos útiles en la prevención y/o tratamiento de la candidiasis. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica A de la invención, o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica A de la invención que comprende dicho agente inhibidor (I) de la actividad de una proteína no glicosilada de la invención.

Ejemplos de fármacos útiles en el tratamiento de infecciones fúngicas incluyen, pero no se limitan a, (i) polienos, tales como nistatina, natamicina, amfotericina B, etc., (ii) azoles, tales como imidazoles (miconazol, clotrimazol), triazoles (fluconazol, itraconazol, ketoconazol), triazoles de segunda generación (voriconazol, ravuconazol, posaconazol), etc., (iii) alilaminas, tales como terbinafina, naftifina, etc., (iv) lipopéptidos, tales como papulacandinas, triterpenos glicosilados, equinocandinas (caspofigingina, anidulofungina, micafingina), etc., y (v) pirimidinas fluoradas, como la flucitosina, etc. Otros agentes antifúngicos incluyen, por ejemplo, yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvin, etc.

La composición farmacéutica A de la invención se puede administrar por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, oral, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, etc.), rectal, etc., típicamente, por vía oral debido al carácter crónico de la enfermedad a tratar.

Ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., y pueden contener los excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada.

Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro “*Tratado de Farmacia Galénica*”, de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

Asimismo, como se ha mencionado previamente, la proteína no glicosilada de la invención puede presentar la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria, por lo que, debido a su potencial proinflamatorio, dicha proteína no glicosilada de la invención puede actuar como antígeno, y, como tal, podría ser utilizada en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso. Aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría, se cree que la proteína Kre9 de *C. albicans* recombinante (Ejemplo 2), un ejemplo representativo de una proteína no glicosilada de la invención, actúa presuntamente uniéndose al receptor de la IL-1 β , por lo que tiene una elevada potencial proinflamatorio debido a su capacidad de unión y activación de dicho receptor, actuando como si se tratara de la propia IL-1 β endógena, una de las citocinas proinflamatorias más importantes de la respuesta inmune.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, en adelante “*composición farmacéutica B de la invención*”, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína no glicosilada de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso.

En el sentido utilizado en esta descripción, una “enfermedad causada por un agente infeccioso” se refiere a la manifestación clínica consecuente a una infección provocada por microorganismos, e.g., bacterias, hongos, virus, protozoos, etc., o por priones. En una realización particular, dicho agente infeccioso es un agente infeccioso que expresa la proteína Kre9 de *C. albicans* o una proteína similar a dicha proteína Kre9 de *C. albicans* que pueda influir en la respuesta inflamatoria, por ejemplo, una especie del género *Candida*, un hongo relacionado que pueda diseminarse por la sangre, etc. Asimismo, en otra realización particular, dicho agente infeccioso es un microorganismo que puede diseminarse por el torrente circulatorio y adherirse a órganos que activan una respuesta inflamatoria e inmune. En una

realización concreta, dicha enfermedad causada por un agente infeccioso es una candidiasis o grupo de infecciones causada por un hongo oportunista que puede tener expresión cutánea, gastrointestinal, sistema respiratorio y genitales del género *Candida*, de los cuales *C. albicans* es el más frecuente. Estos hongos están siempre presentes en la piel y en la mucosa del tracto digestivo, genitourinario y respiratorio de la mayoría de las personas, pero se encuentran controlados por otros microorganismos no patógenos. Cuando se produce un desequilibrio, el aumento desmedido de la población de hongos produce esta u otras micosis.

Los términos “tratar” o “tratamiento”, “cantidad terapéuticamente eficaz”, “proteína no glicosilada de la invención” y “vehículo farmacéuticamente aceptable” ya han sido definidos previamente en esta descripción y son aplicables a la composición farmacéutica B de la invención, al igual que todo lo relativo a la forma de administración de la composición farmacéutica A de la invención. En este sentido, la composición farmacéutica B de la invención se puede administrar por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, oral, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, etc.), rectal, etc. Ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., contienen los excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro “*Tratado de Farmacia Galénica*”, de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

En una realización particular, dicha proteína no glicosilada de la invención presente en la composición farmacéutica B de la invención es una proteína no glicosilada que comprende, o está constituida por, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o por la proteína Kre9, no glicosilada, de *Candida* spp., e.g., la proteína Kre9 no glicosilada de *C. albicans*, tal como la proteína Kre9, no glicosilada, de *C. albicans* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 de la patente norteamericana US 6.582.911 B. En otra realización particular, dicha proteína no glicosilada de la invención es una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de las proteínas no glicosiladas previamente mencionadas.

La proteína no glicosilada de la invención así como las composiciones farmacéuticas que las contienen, pueden ser utilizadas junto con otros fármacos adicionales útiles en el tratamiento de enfermedades causadas por uno o más agentes infecciosos. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica B de la invención, o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición farmacéutica separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica B de la invención que comprende dicha proteína no glicosilada de la invención.

Ejemplos de otros fármacos adicionales útiles en el tratamiento de enfermedades causadas por agentes infecciosos incluyen agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, agentes antivirales, agentes antiparasitarios, agentes antifúngicos, antibióticos, etc. A modo ilustrativo, no limitativo, ejemplos de fármacos adicionales útiles en el tratamiento de infecciones fúngicas incluyen, pero no se limitan a, (i) polienos, tales como nistatina, natamicina, amfotericina B, etc., (ii) azoles, tales como imidazoles (miconazol, clotrimazol), triazoles (fluconazol, itraconazol, ketoconazol), triazoles de segunda generación (voriconazol, ravuconazol, posaconazol), etc., (iii) alilaminas, tales como terbinafina, naftifina, etc., (iv) lipopéptidos, tales como papulacandinas, triterpenos glicosilados, equinocandinas (caspofungina, anidulofungina, micafungina), etc., y (v) pirimidinas fluoradas, como la flucitosina, etc. Otros agentes antifúngicos incluyen, por ejemplo, yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvin, etc.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una *proteína no glicosilada de la invención para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso*; es decir, en otro aspecto, la invención se relaciona con el *empleo de una proteína no glicosilada de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso*. En una realización particular, dicha enfermedad causada por un agente infeccioso es una enfermedad causada por microorganismos, e.g., bacterias, hongos, virus, protozoos, etc., o por priones. En una realización particular, dicho agente infeccioso es un agente infeccioso que expresa la proteína Kre9 de *C. albicans* o una proteína similar a dicha proteína Kre9 de *C. albicans* que pueda influir en la respuesta inflamatoria, por ejemplo, una especie del género *Candida*, un hongo relacionado que pueda diseminarse por la sangre, etc. Asimismo, en otra realización particular, dicho agente infeccioso es un microorganismo que puede diseminarse por el torrente circulatorio y adherirse a órganos que activan una respuesta inflamatoria e inmune. En una realización concreta, dicha enfermedad causada por un agente infeccioso es una candidiasis.

En una realización particular, dicha proteína no glicosilada de la invención presente en la composición farmacéutica B de la invención es una proteína no glicosilada que comprende, o está constituida por, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o por la proteína Kre9, no glicosilada, de *Candida* spp., e.g., la proteína Kre9 no glicosilada de *C. albicans*, tal como la proteína Kre9, no glicosilada, de *C. albicans* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 de la patente norteamericana US 6.582.911 B1. En otra realización particular, dicha proteína no glicosilada de la invención es una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de las proteínas no glicosiladas previamente mencionadas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un *método para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso*, que comprende la administración a un sujeto en necesidad de tratamiento de una proteína no glicosilada de la invención, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con el *uso de un kit* que comprende:

un agente inhibidor (I) de la invención (por ejemplo, un compuesto con capacidad de unión a una proteína no glicosilada de la invención y bloquear la unión de dicha proteína a su receptor o receptores presentes en células endoteliales), para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular inde-

10 seada,

o, alternativamente,

una proteína no glicosilada de la invención para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso.

15

En la presente invención, un “kit” se entiende como un producto que contiene los diferentes productos (e.g., agente inhibidor (I) de la invención o proteína no glicosilada de la invención) formando la composición empaquetada de modo que permita su transporte, almacenamiento y su administración simultánea o secuencial. Los kits de la invención pueden contener de este modo una o más suspensiones, comprimidos, cápsulas, inhaladores, jeringuillas, parches y similares, que contienen dichos productos y que se pueden preparar en una dosis individual o como dosis múltiples. El kit puede contener adicionalmente un soporte adecuado para resuspender las composiciones de la invención tal como un medio acuoso, tal como solución salina, solución de Ringer, solución lactato de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, medios solubles en agua, tal como alcohol, polietilenglicol, propilenglicol y soportes insolubles en agua tal como aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato de bencilo. Otros componentes que pueden estar presentes en el kit es un envase que permite mantener las formulaciones de la invención dentro de determinados límites. Los materiales adecuados para preparar tales envases incluyen vidrio, plástico, polietileno, polipropileno, policarbonato y similares, botellas, viales, papel, bolsitas y similares.

20

El kit de la invención puede contener adicionalmente instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de las diferentes formulaciones farmacéuticas presentes en el kit. Por lo tanto, en una forma de realización particular, el kit de la invención comprende además instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de los diferentes componentes. Dichas instrucciones se pueden encontrar en forma de material impreso o en forma de soporte electrónico que puede almacenar las instrucciones tal que puedan ser leídas por un sujeto, tal como medios de almacenamiento electrónico (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Los medios pueden adicional o alternativamente contener sitios Web en Internet proporcionando dichas instrucciones.

25

Todas las realizaciones particulares que definen este aspecto inventivo han sido citadas, descritas y explicadas en aspectos inventivos anteriores, por lo que no resulta necesario repetirlos.

30

45 II. Aplicaciones de la proteína glicosilada de la invención

La invención también se relaciona con las aplicaciones de una proteína glicosilada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio.

50

Por razones de simplicidad, bajo la denominación “*proteína glicosilada de la invención*” se incluye dicha proteína glicosilada que comprende la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO: 1, así como las variantes y fragmentos funcionalmente equivalentes de la misma con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio.

55

En una realización particular, la proteína glicosilada de la invención comprende, o está constituida por, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, la cual contiene una zona central rica en residuos de serina y treonina característicos de una potencial O-glicosilación; dicha proteína presenta, al menos, la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, capacidad que puede ser determinada poniendo en contacto células tumorales con células endoteliales estimuladas con dicha proteína glicosilada de la invención.

60

En el sentido utilizado en esta descripción “*proteína glicosilada de la invención*” hace referencia a que dicha proteína que comprende, o está constituida por, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, contiene al menos un resto de un azúcar en alguno de los sitios potenciales de glicosilación, por ejemplo, en alguno de los residuos de serina y treonina característicos de una potencial O-glicosilación presentes en dicha proteína.

65

En una realización particular, la proteína glicosilada de la invención es la proteína Kre9, glicosilada, de una especie del género *Candida* (*Candida* spp.), por ejemplo, la proteína Kre9 no glicosilada de *C. albicans*. En una realización

concreta, la proteína glicosilada de la invención es la proteína Kre9 nativa (glicosilada) de *C. albicans* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 [Accesión: XM_717838; Versión: XM_717838.1, GI: 68465725; organismo *C. albicans* SC5314]. En otra realización concreta, la proteína glicosilada de la invención es la proteína Kre9, glicosilada, de *C. albicans* que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en US 6.582.911 B1 (en concreto en la SEQ ID NO: 2 incluida en dicha patente norteamericana).

Diversos ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que no solo la proteína Kre9 de *C. albicans* (CaKre9) recombinante expresada en *E. coli* y, por tanto, no glicosilada, es capaz de aumentar significativamente la adhesión de células tumorales (células de melanoma MB16) al endotelio sinusoidal hepático (ESH), sino también la proteína Kre9 nativa de *C. albicans*.

En otra realización particular, la proteína glicosilada de la invención comprende, o está constituida por, una variante, glicosilada (es decir, contiene, al menos un resto de un azúcar en alguno de los sitios potenciales de glicosilación), de dicha proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y que presenta, al menos, la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio. En el sentido utilizado en esta descripción, el término “variante” se refiere a un péptido (o proteína) sustancialmente homólogo y funcionalmente equivalente a dicha proteína que comprende la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO: 1. Las expresiones “sustancialmente homólogo” y “funcionalmente equivalente”, aplicados a proteínas y péptidos, ya han sido previamente definidos. La capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio se puede determinar mediante cualquier ensayo apropiado conocido por los expertos en la materia; por ejemplo, poniendo en contacto células tumorales con células endoteliales estimuladas con dicha proteína glicosilada de la invención; para ello, dicha proteína glicosilada de la invención se une al receptor apropiado y lo activa estimulando la adhesión tumoral al endotelio. En una realización particular, la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio puede determinarse mediante un ensayo como el descrito en el Ejemplo 2 con las debidas modificaciones.

En una realización concreta, dicha variante es una forma mutante de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, glicosilada, que mantiene la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio. Dicha forma mutante puede presentar inserciones, deleciones o modificaciones de uno o más aminoácidos respecto a la proteína que comprende la SEQ ID NO: 1, con la condición de que contenga al menos un resto de un resto de un azúcar en alguno de los sitios potenciales de glicosilación y conserve la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio.

Asimismo, en el sentido utilizado en esta descripción, el término “fragmento” se refiere a un péptido que comprende una porción de dicha proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, es decir, una secuencia de aminoácidos contiguos comprendida dentro de dicha SEQ ID NO: 1, que contiene, al menos un resto de un azúcar en alguno de los sitios potenciales de glicosilación; para su empleo en este aspecto inventivo de que esté glicosilado (es decir, que contenga al menos un resto de un azúcar en alguno de los sitios potenciales de glicosilación) y sea funcionalmente equivalente, es decir, que mantenga la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio.

La proteína glicosilada de la invención, al igual que la proteína no glicosilada de la invención, presenta, al menos, la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, capacidad que puede ser determinada poniendo en contacto células tumorales con células endoteliales estimuladas con dicha proteína glicosilada de la invención mediante la unión o interacción de dicha proteína glicosilada de la invención con el receptor apropiado, cuya activación parece estimular la adhesión tumoral al endotelio. Además, la proteína glicosilada de la invención puede presentar la capacidad de unirse a un receptor apropiado, tal como un receptor de una citocina (mimetizando de ese modo a la citocina correspondiente) o un receptor al que se une o con el que interactúa la proteína Kre9 de *C. albicans*; algunos de dichos receptores pueden estimular la adhesión celular al endotelio. En una realización particular, el receptor al que se une la proteína glicosilada de la invención es un receptor de una citocina, tal como el receptor de la IL-1 β , por lo que dicha proteína glicosilada de la invención puede actuar mimetizando dicha citocina (IL-1 β). Por tanto, la proteína glicosilada de la invención puede ser utilizada en la identificación de compuestos potencialmente útiles en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades asociadas con una adhesión celular indeseada. Asimismo, la proteína glicosilada de la invención puede presentar la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria, y, por tanto, debido a su potencial proinflamatorio, actuar como antígeno, por lo que podría ser utilizada en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso.

La proteína glicosilada de la invención, si se desea, puede formar parte de una proteína de fusión. En este sentido, a modo ilustrativo, no limitativo, dicha proteína de fusión puede contener una región A constituida por un primer péptido que comprende la proteína glicosilada de la invención unida a una región B que comprende un segundo péptido. Dicho segundo péptido puede ser cualquier péptido apropiado, por ejemplo, un péptido útil para identificar la proteína recombinante y/o para purificar la proteína recombinante. Dicha región B puede estar unida a la región amino-terminal de dicha región A, o bien, alternativamente, dicha región B puede estar unida a la región carboxilo-terminal de dicha región A. Ambas regiones A y B pueden estar unidas directamente o a través de un péptido espaciador (linker) entre dichas regiones A y B. La proteína de fusión puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante la expresión génica de la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína de fusión en células hospedadoras eucarióticas apropiadas.

La proteína glicosilada de la invención se puede obtener a partir de un organismo productor de dicha proteína glicosilada, mediante un procedimiento que comprende cultivar dicho organismo bajo condiciones apropiadas para la expresión de dicha proteína y recuperarla. En una realización particular de esta invención, el organismo productor de la proteína glicosilada de la invención es un hongo o una levadura, o, alternativamente, una célula eucariota que comprende un polinucleótido que codifica la proteína glicosilada de la invención; en una realización particular, dicho organismo es una especie del género *Candida*, e.g., *C. albicans*.

A partir de la información proporcionada por la proteína glicosilada de la invención, se puede identificar y aislar la secuencia de ácido nucleico que codifica para dicha proteína mediante el empleo de técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante la creación de genotecas de DNA genómico (DNAG) o de DNA copia (cDNA) de organismos productores de dicha proteína; el diseño de oligonucleótidos adecuados para amplificar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una región del clon genómico de los organismos productores de dicha proteína que sirva para obtener sondas destinadas a escrutar dichas genotecas; y el análisis y selección de los clones positivos. En una realización particular, se ha diseñado una pareja de oligonucleótidos iniciadores constituida por los oligonucleótidos cuyas secuencias se muestran en SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO: 4, para amplificar el gen que codifica para la proteína Kre9 de *C. albicans*. Dichos oligonucleótidos iniciadores constituyen un aspecto adicional de esta invención.

En una realización particular, el polinucleótido que codifica para la proteína glicosilada de la invención comprende, o está constituido por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En una realización concreta, el polinucleótido que codifica para la proteína Kre9 nativa (glicosilada), de *C. albicans* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 [Accesión: XMJ717838; Versión: XM_717838.1, GI: 68465725; organismo *C. albicans* SC5314]. En otra realización concreta, el polinucleótido que codifica para la proteína Kre9, glicosilada, de *C. albicans* tiene la secuencia de nucleótidos descrita en US 6.582.911 B1 (en concreto en la SEQ ID NO: 1 incluida en dicha patente norteamericana).

Alternativamente, el polinucleótido que codifica para la proteína glicosilada de la invención puede presentar variaciones en su secuencia respecto a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, por ejemplo, sustituciones, inserciones y/o deleciones de uno o más nucleótidos, con la condición de que el polinucleótido resultante codifica para una proteína no glicosilada de la invención. Por tanto, dentro del ámbito de la presente invención se encuentran polinucleótidos sustancialmente homólogos al polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos se muestra en la SEQ ID NO: 2 y codifica para una proteína no glicosilada de la invención.

Dicho polinucleótido que codifica para la proteína glicosilada de la invención puede estar contenido en una construcción génica que comprende dicho polinucleótido, la cual puede incorporar, operativamente unida, una secuencia reguladora de la expresión de dicho polinucleótido que codifica para la proteína glicosilada de la invención, constituyendo de este modo un cassette de expresión. Asimismo, dicha construcción génica puede ser insertada en un vector apropiado. La elección del vector dependerá del organismo hospedador en el que se va a introducir posteriormente dicho vector. En una realización particular, el vector es un plásmido útil para transformar células u organismos eucariotas, e.g., *S. cerevisiae*. Dicho vector puede ser utilizado para transformar organismos susceptibles de ser transformados por dicho vector. Dichos organismos, dado que la proteína a expresar (proteína glicosilada de la invención) debe estar glicosilada, son organismos eucariotas, por ejemplo, levaduras, tales como *S. cerevisiae* (US 6.582.911), etc.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un *procedimiento para la obtención de una proteína glicosilada de la invención*, que comprende cultivar un organismo eucariota que contiene la secuencia que codifica para la proteína glicosilada de la invención bajo condiciones que permiten la producción de dicha proteína y, si se desea, recuperar dicha proteína glicosilada de la invención del medio de cultivo. Las condiciones para optimizar el cultivo de dicho organismo eucariota de la invención dependerá del organismo eucariota utilizado; dichas condiciones son conocidas por los expertos en la materia. El procedimiento para producir la proteína glicosilada de la invención incluye, opcionalmente, el aislamiento y purificación de dicha proteína glicosilada de la invención.

Como se ha mencionado previamente, la proteína glicosilada de la invención tiene la capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio y la capacidad de unirse a un receptor apropiado, tal como un receptor de una citocina (mimetizando de ese modo a la citocina correspondiente) o un receptor al que se une o con el que interactúa la proteína Kre9 de *C. albicans*, por ejemplo, receptores que pueden estimular la adhesión celular al endotelio, tal como, el receptor de la IL-1 β , por lo que dicha proteína no glicosilada de la invención puede actuar mimetizando dicha citocina (IL-1 β). Por tanto, la proteína glicosilada de la invención puede ser utilizada en la identificación e compuestos potencialmente útiles en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada con una adhesión celular indeseada.

El término “enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada” ya ha sido definido previamente e incluye cáncer, metástasis, restenosis, enfermedades que provocan una respuesta inmune celular y enfermedades inflamatorias.

Identificación de compuestos potencialmente terapéuticos

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para identificar un compuesto potencialmente útil para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada, en adelante *método de identificación (II) de compuestos potencialmente terapéuticos de la invención*, que comprende:

- a) poner en contacto una célula que expresa un receptor al que se une, o con el que interactúa, una proteína glicosilada de la invención con una proteína glicosilada de la invención y con el compuesto candidato, y
- b) identificar aquellos compuestos que inhiben la unión de dicha proteína glicosilada de la invención a dicho receptor.

En una realización particular, el método de identificación de compuestos potencialmente terapéuticos de la invención es particularmente útil y resulta adecuado para identificar y seleccionar compuestos potencialmente útiles para la prevención y/o el tratamiento de procesos tumorales, procesos metastáticos, restenosis, enfermedades que provocan una respuesta inmune celular y/o enfermedades inflamatorias.

Aunque prácticamente cualquier célula que expresa un receptor al que se une, o con el que interactúa, una proteína glicosilada de la invención puede ser utilizada en la puesta en práctica de dicho método, en una realización particular, dicha célula que expresa un receptor al que se une, o con el que interactúa, una proteína glicosilada de la invención es una célula que expresa un receptor de una citocina, e.g., un receptor de la IL-1 β , o un receptor de cualquier otra citocina, o, en general, una célula que expresa un receptor al que se une la proteína Kre9 de *C. albicans*; así, en una realización particular, dicha célula que expresa un receptor al que se une, o con el que interactúa, una proteína glicosilada de la invención es una célula del endotelio apropiada, por ejemplo, una célula del endotelio sinusoidal hepático (ESH).

Tratamiento y/o prevención de enfermedades asociadas a una adhesión celular indeseada

Los compuestos identificados según el método de identificación de compuestos potencialmente terapéuticos de la invención pueden ser utilizados en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un *agente inhibidor de la actividad de la proteína glicosilada de la invención para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada*, tal como un proceso tumoral, un proceso metastático, restenosis, una enfermedad que provoca una respuesta inmune celular y/o una enfermedad inflamatoria. Es decir, en otras palabras, en otro aspecto, la invención se relaciona con el *empleo de un agente inhibidor de la actividad de la proteína glicosilada de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada*, tal como un proceso tumoral, un proceso metastático, restenosis, una enfermedad que provoca una respuesta inmune celular y/o una enfermedad inflamatoria.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un *método para la prevención y/o el tratamiento (II) de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada*, tal como un proceso tumoral, un proceso metastático, restenosis, una enfermedad que provoca una respuesta inmune celular y/o una enfermedad inflamatoria, que comprende la administración a un sujeto en necesidad de tratamiento de un agente inhibidor de la actividad de una proteína glicosilada de la invención (en ocasiones referido como “agente inhibidor (II) de la invención”), en una cantidad terapéuticamente eficaz.

En el contexto de la presente invención, el término “proteína glicosilada de la invención” ya ha sido definido previamente. En una realización particular de la invención, la proteína glicosilada de la invención comprende, o está constituida por, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o por la proteína Kre9 nativa (glicosilada), de *Candida* spp., e.g., la proteína Kre9 glicosilada de *C. albicans*, tal como la proteína Kre9, glicosilada, de *C. albicans* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 de la patente norteamericana US 6.582.911 B1. En otra realización particular de la invención, la proteína glicosilada de la invención es una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de las proteínas no glicosiladas previamente mencionadas.

En el contexto de la presente invención se entiende por “*agente inhibidor (II) de la invención*”, cualquier sustancia o compuesto que sea capaz de impedir o bloquear que la proteína glicosilada de la invención realice su función (actividad), es decir, impedir que dicha proteína glicosilada de la invención pueda activar/estimular la adhesión de células tumorales al endotelio. Dicho agente inhibidor (II) de la invención puede ser igual o diferente a dicho agente inhibidor (I) de la invención. Aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría se cree que dicha actividad estimuladora de la adhesión tumoral al endotelio puede ser realizada mediante la activación de los receptores adecuados (e.g., el receptor de la IL-1 β , etc.) por parte de la proteína glicosilada de la invención, por lo que la unión de un compuesto a dicha proteína glicosilada de la invención puede dar como resultado que la proteína glicosilada de la invención no se pueda unir a su receptor o receptores. Ensayos para determinar si un compuesto es un agente inhibidor de una proteína glicosilada de la invención pueden ser diseñados por los expertos en la materia a la vista de la información proporcionada por esta invención, por ejemplo, a partir de la información contenida en el Ejemplo 2.

A modo ilustrativo, no limitativo, agentes inhibidores de la actividad de la proteína no glicosilada de la invención para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, péptidos inhibidores de dicha proteína glicosilada de la invención, anticuerpos dirigidos específicamente contra epítomos de dicha proteína glicosilada de la invención esenciales para desempeñar su función, etc. Por tanto, en una realización particular de la invención, dicho agente inhibidor de la invención se selecciona del grupo formado por péptidos inhibidores y anticuerpos.

El término “péptido inhibidor”, tal como se utiliza en este aspecto inventivo, hace referencia a un péptido capaz de unirse a una proteína glicosilada de la invención e inhibir su actividad tal como se ha explicado anteriormente, es decir, impedir que la proteína glicosilada de la invención pueda inducir o estimular la adhesión de células tumorales al endotelio.

Por “anticuerpo inhibidor” se entiende en el contexto de este aspecto inventivo de la presente invención todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse a una proteína glicosilada de la invención, impidiendo que dicha proteína glicosilada de la invención pueda inducir o estimular la adhesión de células tumorales al endotelio. Dichos anticuerpos pueden ser preparados usando cualquiera de los métodos que son conocidos para el experto en la materia y se han mencionado previamente pero utilizando en este caso una proteína glicosilada de la invención en lugar de una proteína no glicosilada de la invención.

En una realización particular, dicho anticuerpo inhibidor es un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína glicosilada de la invención, tal como una proteína glicosilada que comprende, o está constituida por, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o por la proteína Kre9, glicosilada, de *Candida* spp., e.g., la proteína Kre9 glicosilada de *C. albicans*, tal como la proteína Kre9, glicosilada, de *C. albicans* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 de la patente norteamericana US 6.582.911 B1. En otra realización particular, dicho anticuerpo inhibidor es un anticuerpo que reconoce específicamente una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de las proteínas glicosiladas previamente mencionadas. En una realización particular, dicho anticuerpo inhibidor es un anticuerpo que reconoce la IL-1 β , e.g., un anticuerpo anti-IL-1 β de mamífero.

Tal como se ha expresado al comienzo de la descripción, ahora se ha descubierto una nueva ventana terapéutica en el tratamiento de enfermedades asociadas a una adhesión celular indeseada, tales como procesos tumorales (cáncer), procesos metastáticos (metástasis), restenosis, enfermedades que provocan una respuesta inmune celular y/o enfermedades inflamatorias.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, en adelante “*composición farmacéutica C de la invención*”, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor (II) de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de enfermedades asociadas a una adhesión celular indeseada. Ejemplos de enfermedades asociadas a una adhesión celular indeseada incluyen procesos tumorales (cáncer), procesos metastáticos (metástasis), restenosis, enfermedades que provocan una respuesta inmune celular y/o enfermedades inflamatorias y han sido citadas previamente en la presente memoria.

Los términos “cantidad terapéuticamente eficaz”, “tratamiento” o “tratar”, “transportador, adyuvante y/o vehículo” y “farmacéuticamente aceptable” ya han sido definidos previamente en esta descripción.

El agente inhibidor (II) de la invención así como las composiciones farmacéuticas que los contienen, pueden ser utilizados junto con otros fármacos adicionales útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas a una proliferación y/o adhesión celular indeseada. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica C de la invención, o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición farmacéutica separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica C de la invención que comprende dicho agente inhibidor (II) de la actividad de una proteína glicosilada de la invención. Ejemplos de dichos fármacos adicionales útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas a una proliferación celular indeseada ya han sido mencionados previamente.

Inducción de una respuesta inflamatoria

Alternativamente, el agente inhibidor (II) de la invención así como las composiciones farmacéuticas que los contienen, pueden ser utilizados junto con otros fármacos adicionales útiles en el tratamiento de infecciones fúngicas, por ejemplo, agentes antifúngicos útiles en la prevención y/o tratamiento de la candidiasis. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica C de la invención, o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica A de la invención que comprende dicho agente inhibidor de la actividad de una proteína glicosilada de la invención. Ejemplos de fármacos útiles en el tratamiento de infecciones fúngicas ya han sido mencionados previamente.

La composición farmacéutica C de la invención se puede administrar por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, oral, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, etc.), rectal, etc.

Ejemplos ilustrativos de las distintas formas farmacéuticas de administración y de su preparación se han descrito previamente en esta descripción.

Asimismo, como se ha mencionado previamente, la proteína glicosilada de la invención puede presentar la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria, por lo que, debido a su potencial proinflamatorio, dicha proteína glicosilada de la invención puede actuar como antígeno, y, como tal, podría ser utilizada en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso. Aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría, se cree que la proteína Kre9 nativa de *C. albicans*, un ejemplo representativo de una proteína glicosilada de la invención, actúa presuntamente uniéndose al receptor de la IL-1 β , por lo que tiene un elevada potencial proinflamatorio debido a su capacidad de unión y activación de dicho receptor, actuando como si se tratara de la propia IL-1 β endógena, una de las citocinas proinflamatorias más importantes de la respuesta inmune.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, en adelante “*composición farmacéutica D de la invención*”, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína glicosilada de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso.

El término “enfermedad causada por un agente infeccioso” ya ha sido definido previamente en esta descripción y se refiere a la manifestación clínica consecuenta a una infección provocada por microorganismos, e.g., bacterias, hongos, virus, protozoos, etc., o por priones. En una realización particular, dicho agente infeccioso es un agente infeccioso que expresa la proteína Kre9 de *C. albicans* o una proteína similar a dicha proteína Kre9 de *C. albicans* que pueda influir en la respuesta inflamatoria, por ejemplo, una especie del género *Candida*, etc. Asimismo, en otra realización particular, dicho agente infeccioso es un microorganismo que puede diseminarse por el torrente circulatorio y adherirse a órganos que activan una respuesta inflamatoria e inmune. En una realización concreta, dicha enfermedad causada por un agente infeccioso es una candidiasis.

En una realización particular, dicha proteína no glicosilada de la invención presente en la composición farmacéutica D de la invención es una proteína glicosilada que comprende, o está constituida por, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o por la proteína Kre9 nativa (glicosilada) de *Candida* spp., e.g., la proteína Kre9 glicosilada de *C. albicans*, tal como la proteína Kre9 glicosilada, de *C. albicans* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 de la patente norteamericana US 6.582.911 B1. En otra realización particular, dicha proteína no glicosilada de la invención es una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de las proteínas glicosiladas previamente mencionadas.

La proteína glicosilada de la invención así como las composiciones farmacéuticas que las contienen, pueden ser utilizadas junto con otros fármacos adicionales útiles en el tratamiento de enfermedades causadas por uno o más agentes infecciosos. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica D de la invención, o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición farmacéutica separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica D de la invención que comprende dicha proteína glicosilada de la invención. Ejemplos ilustrativos de otros fármacos adicionales útiles en el tratamiento de enfermedades causadas por agentes infecciosos ya han sido mencionados previamente en esta descripción.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una *proteína glicosilada de la invención para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso*: es decir, en otro aspecto, la invención se relaciona con el *empleo de una proteína glicosilada de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso*. En una realización particular, dicha enfermedad causada por un agente infeccioso es una enfermedad causada por microorganismos, e.g., bacterias, hongos, virus, protozoos, etc., o por priones. En una realización particular, dicho agente infeccioso es un agente infeccioso que expresa la proteína Kre9 de *C. albicans* o una proteína similar a dicha proteína Kre9 de *C. albicans* que pueda influir en la respuesta inflamatoria, por ejemplo, una especie del género *Candida*, un hongo relacionado que pueda diseminarse por la sangre, etc. Asimismo, en otra realización particular, dicho agente infeccioso es un microorganismo que puede diseminarse por el torrente circulatorio y adherirse a órganos que activan una respuesta inflamatoria e inmune. En una realización concreta, dicha enfermedad causada por un agente infeccioso es una candidiasis.

En una realización particular, dicha proteína glicosilada de la invención presente en la composición farmacéutica D de la invención es una proteína glicosilada que comprende, o está constituida por, la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o por la proteína Kre9, glicosilada, de *Candida* spp., e.g., la proteína Kre9 no glicosilada de *C. albicans*, tal como la proteína Kre9, glicosilada, de *C. albicans* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 de la patente norteamericana US 6.582.911 B1. En otra realización particular, dicha proteína no glicosilada de la invención es una variante o un fragmento funcionalmente equivalente de las proteínas glicosiladas previamente mencionadas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un *método para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso*, que comprende la administración a un sujeto en necesidad de tratamiento de una proteína glicosilada de la invención, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

ES 2 372 103 A1

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit que comprende:

un agente inhibidor (II) de la invención (por ejemplo, un compuesto con capacidad de unión a una proteína glicosilada de la invención y bloquear la unión de dicha proteína a su receptor o receptores presentes en células endoteliales), para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada,

o, alternativamente,

una proteína glicosilada de la invención para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso.

Dicho “kit” presenta las características previamente mencionadas en esta descripción en cuanto a componentes, instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de las diferentes formulaciones farmacéuticas presentes en el ki, etc. Todas las realizaciones particulares que definen este aspecto inventivo han sido citadas, descritas y explicadas en aspectos inventivos anteriores, por lo que no resulta necesario repetirlas.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Expresión en E. coli de la proteína Kre9 de C. albicans (CaKre9) recombinante

1. Materiales y métodos

1.1 Levaduras

Se han empleado cuatro cepas de *Candida albicans*, concretamente, las cepas *C. albicans* UPV1413 y *C. albicans* UPV1360 pertenecientes a la Colección de Cultivos de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) que fueron aisladas de pacientes con candidiasis sistémica, la cepa CA2, una mutante agerminativa gentilmente cedida por A Cassone (Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia) y la cepa de referencia NCPF 3153 procedente de National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF) (Bristol, Reino Unido).

Las cepas fueron mantenidas a 4°C en tubos inclinados de medio agar glucosa Sabouraud (SDA) [1 litro de caldo de Sabouraud (SDB) (glucosa 20 g/l y peptona 10 g/l) y 15 g/l de agar] después de una incubación previa de 24 h a 24°C. Se realizaron resiembras mensuales en el mismo medio de mantenimiento.

1.2 Extracción de DNA de levaduras

Las levaduras (*C. albicans* UPV1413) se cultivaron en 20 ml de caldo de Sabouraud (SDB) [glucosa 20 g/l y peptona 10 g/l] durante 24 h. Las células obtenidas fueron recogidas mediante centrifugación y se lavaron dos veces con agua destilada estéril. Posteriormente, las levaduras se resuspendieron en 400 μ l de tampón Tris 10 mM pH 8 y la suspensión celular se pasó a un tubo de microcentrífuga con 0,3 g de bolas de vidrio estériles (0,5 mm de diámetro). Se agitaron vigorosamente los tubos durante 1 minuto en un vórtex. La mezcla se incubó durante 10 minutos en agua hirviendo, se centrifugó a 2.500 g, se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de DNA.

1.3 Medida de la concentración de DNA

La medida de la concentración de DNA en una muestra producto de la extracción de DNA genómico, plasmídico o producto de PCR, se realizó mediante la medida de la absorbancia a 260/280 nm en un NanoPhotometer (Implen).

1.4 Clonación de DNA en vectores plasmídicos

Las técnicas básicas de manipulación de ácidos nucleicos han sido descritas con detalle por Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.* 2001, Molecular cloning: A laboratory manual).

El vector utilizado en los experimentos de clonación y expresión de la proteína Kre9 de *C. albicans* (CaKre9) recombinantes fue el vector comercial pET-Blue (Novagen). Entre las particularidades interesantes que presenta este vector se encuentra la presencia de una secuencia que codifica en el extremo amino terminal para una cola HSV que permite la inmunodetección de la proteína recombinante, siempre y cuando el inserto se haya clonado en la pauta de lectura correcta. Asimismo, el vector pET-Blue presenta una secuencia que codifica para una cola de 6 histidinas, lo que permite la purificación por columna de afinidad de la proteína recombinante, siempre que, como en el caso de la cola HSV, el inserto haya sido clonado en la pauta de lectura correcta. Además, este vector tiene la característica de que su zona de clonaje múltiple, donde cortan los enzimas de restricción una única vez en todo el plásmido, se sitúa

ES 2 372 103 A1

dentro del gen que codifica el péptido lacZ- α [de este modo, las colonias en placas en presencia de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) y X-gal son de color azul mientras que cuando se introduce el inserto, se trunca el péptido lacZ- α y las colonias formadas son de color blanco].

5

1.5 Obtención del inserto de DNA

La secuencia de DNA a clonar en el vector pET-Blue fue un producto de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) obtenido a partir de la amplificación de la secuencia codificante del gen Kre9 de *C. albicans* (CaKre9) a partir del DNA genómico una vez comprobada la ausencia de intrones. Los cebadores utilizados para la producción de la proteína CaKre9 recombinante fueron los siguientes:

15 Directo: 5'-aaccegaattcgcctatcagacacatctagcaaa-3' (SEQ ID NO: 3); e

Inverso: 5'-tcctctctgcagatccaaccatcttctctc-3' (SEQ ID NO: 4)

20 Las mezclas de reacción utilizadas en la PCR estaban constituidas por 3,5 μ l de agua, 2,5 μ l de tampón NH4 10X, 1,5 μ l de MgCl₂ 50 mM, 0,75 μ l de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 25 mM, 10 μ l (860 ng) de DNA de levadura (1/10), 3 + 3 μ l de cebadores y 0,75 μ l de Taq polimerasa (Bioline).

25 El protocolo seguido para la amplificación mediante PCR del gen de *C. albicans* que codifica la proteína Kre9 (CaKre9) fue el siguiente:

30

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
95	5	2
95	1	40
48	1	
72	1	
72	10	1

35

40

45 Durante el diseño de los cebadores, se introdujeron en la secuencia dianas específicas para los enzimas de restricción y se añadieron algunas bases más en el extremo para facilitar la labor de los enzimas.

50 Para visualizar las secuencias amplificadas, las bandas de DNA se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa en concentración de 1,5% y 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio, a 100 V durante aproximadamente 45 minutos en una cámara de electroforesis Wide Mini-Sub CII GT (Bio-Rad). Cuando fue necesario, el DNA se recuperó desde el gel utilizando para ello el Ultra Clean GelSpin Gel purification kit (MoBio) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante.

55

1.6 Digestión con endonucleasas de restricción y ligación

Las condiciones para el uso de los enzimas de restricción fueron las especificadas por la casa comercial suministradora (Takara). Se mezclaron en un microtubo de 500 μ l las concentraciones indicadas a continuación:

60

65

Mezcla de reacción para el corte del plásmido pET-Blue con los enzimas de restricción	
H ₂ O	10 μ l

ES 2 372 103 A1

Tampón H (10X)	2 μ l
EcoRI	1 μ l (15 u)
PstI	1 μ l (15 u)
Plásmido	6 μ l (150 ng)

Mezcla de reacción para el corte del gen Kre9 de <i>C. albicans</i> (CaKre9) amplificado mediante PCR con los enzimas de restricción	
H ₂ O	40 μ l (600 ng)
Tampón H (10X)	5 μ l
EcoRI	2,5 μ l (15 u)
PstI	2,5 μ l (15 u)

La incubación se realizó a 37°C durante 1 h.

El DNA cortado, obtenido tras la digestión con los enzimas de restricción, fue purificado antes de proceder a la ligación mediante el kit Ultra Clean GelSpin Gel purification kit (MoBio), utilizando el enzima T4-DNA ligasa, siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. En los experimentos de ligación, la proporción molar vector:inserto utilizada fue de 1:3. La reacción de ligación se llevó a cabo a 16°C durante aproximadamente 18 h.

1.7 Transformación de células competentes

Para los experimentos de transformación se utilizaron las células competentes Novablue Singles (Novagen), que aseguran una elevada eficiencia de transformación y un elevado número de copias de plásmido. Los viales de células competentes mantenidos a -80°C se descongelaron manteniéndolos en hielo aproximadamente 5 minutos, tras los cuales se añadieron 10 ng de mezcla de ligación. Se incubaron los tubos durante 5 minutos más en hielo, y a continuación se sometió a las células a un choque térmico de 1 minuto a 42°C y se incubaron en hielo 5 minutos más. Seguidamente se sembraron en placas de agar LB suplementadas con tetraciclina 12,5 μ g/ml y carbenicilina 50 μ g/ml, y se incubaron toda la noche a 37°C.

1.8 Rastreo rápido de clones positivos

Se siguió la técnica descrita por Le-Gouill & Dery [Le Gouill, C. & Déry, C.V. Nucleic Acids Research. 19 (23):6655, 1991]. Este procedimiento permitió el rastreo rápido de DNA plasmídico a partir de colonias crecidas en placas de agar sin necesidad de extracción previa. Con puntas estériles, se tocó la superficie de la colonia crecida para resembrarla en otra placa de agar suplementada con el antibiótico correspondiente, para así obtener una réplica de la colonia. El resto de la colonia se transfirió a un tubo con 10 μ l de tampón de lisis [90 μ l de tampón de carga (4 g de sacarosa, trazas de azul de bromofenol y 10 ml de agua MiliQ), 400 μ l de tampón I (100 μ l de SDS al 10%, 20 μ l de NaOH 10 N y 880 μ l de agua MiliQ) y 110 μ l de agua MiliQ] y se resuspendió pipeteando suavemente para evitar producir burbujas. Se añadieron 3 μ l de tampón II [500 μ l de acetato potásico, 78 μ l de ácido fórmico al 85% y 222 μ l de agua MiliQ] y se centrifugaron los tubos durante 4 minutos a 13.000 rpm; se cargaron las muestras evitando el precipitado en un gel de agarosa al 0,7%.

1.9 Purificación de DNA plasmídico

Para la preparación del DNA plasmídico a partir de un cultivo líquido de células transformadas se utilizó el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). Para comprobar la presencia del inserto en el DNA obtenido se procedió a digerir una muestra con los enzimas de restricción utilizados en el clonaje y tras la digestión se separó mediante electroforesis en gel de agarosa.

ES 2 372 103 A1

1.10 Inducción de la expresión de proteínas recombinantes

Tras comprobar la presencia del inserto de interés en el vector y su inserción en pauta de lectura correcta con las colas His y HSV, se transformaron células Tuner (DE3)pLac (Novagen) con el plásmido recombinante. La metodología seguida para la transformación de esta cepa fue la misma que la seguida en el caso de la cepa Novablue Singles. En este caso, las células se sembraron en placas de LB agar suplementadas con carbenicilina 50 $\mu\text{g/ml}$ y cloranfenicol 34 $\mu\text{g/ml}$.

Se inocularon 5 ml de caldo LB [10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de cloruro sódico] suplementado con carbenicilina y cloranfenicol a partir de una colonia transformada con el plásmido recombinante. Se utilizó como control una colonia de células transformadas con el plásmido original. Se incubaron los tubos toda la noche a 37°C y 120 rpm. Al día siguiente, se tomaron 500 μl de cultivo para inocular 4,5 ml de medio fresco y se inocularon hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de entre 0,5-1. Una vez alcanzada dicha densidad óptica, se separó el cultivo en 2 alícuotas de 2,5 ml y a uno de ellos se le añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM. Se incubaron los cultivos durante 4 h más, tras las cuales se centrifugó 1 ml de cada cultivo. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 200 μl de tampón de electroforesis y se analizó mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE al 10%.

1.11 Purificación de las proteínas recombinantes

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó utilizando el kit His-Bind (Novagen). Brevemente, se partió de un cultivo en medio LB suplementado con carbenicilina y cloranfenicol crecido durante 12 h para inocular 250 ml de medio fresco e inducir la expresión de la proteína como se describe en el apartado 1.10. Las células se recogieron por centrifugación a 2.500 g durante 5 minutos, se secó al máximo y se pesó. Con el fin de incrementar la eficiencia de extracción, se mantuvo la pastilla de células a -20°C toda la noche. Al día siguiente, se añadieron 5 ml de reactivo BugBuster por gramo de células y 1 μl de benzonasa por mililitro de reactivo BugBuster usado para resuspender las células. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente en un agitador orbital durante 20 minutos, tras lo que se centrifugaron los tubos a 13.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. De esta manera, las proteínas contenidas en la fracción soluble se separaron de los restos celulares. Los sobrenadantes se mantuvieron a -20°C hasta su utilización.

La purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando la resina His-Bind es un método rápido de purificación de proteínas que poseen una cola de 6 histidinas (6 His) a temperatura ambiente o, alternativamente, a 4°C. La preparación de la columna se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el suministrador. En cada tanda de purificación se trató 1 g de extracto celular que fue eluido finalmente en 5 ml de tampón de elución. El grado de purificación obtenido y el rendimiento se analizaron mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie e inmunodetección de la proteína recombinante con el anticuerpo monoclonal HSV-Tag (Novagen).

1.12 SDS-PAGE (1D)

Los distintos extractos proteicos fueron analizados mediante SDS-PAGE en el sistema Miniprotein II (Bio-Rad) durante 45 minutos a 70 mA, 100 W y 200 V. Para la determinación de los pesos moleculares de las bandas obtenidas en la electroforesis se utilizaron como marcadores de peso molecular los estándares de alto peso molecular HMW (Sigma) [Miosina (205 kDa), α -galactosidasa (116 kDa), Fosforilasa B (97,4 kDa), Albúmina bovina (66 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa) y Anhidrasa carbónica (29 kDa)].

1.13 Tinción de Coomassie G250

Previo a la adición del colorante Bio-Safe (Bio-Rad) basado en el azul de Coomassie coloidal G250, se realizaron 3 lavados de 5 minutos en agua destilada. A continuación, se añadió el colorante durante 1 h. Finalizado este tiempo se volvió a lavar con agua destilada.

1.14 Western Blot

Se emplearon membranas Inmobilon-P (Millipore) previamente tratadas en un disolvente orgánico (metanol) y posteriormente en agua desionizada. Brevemente, la membrana previamente humedecida con metanol y agua miliQ se mantuvo durante 10 minutos en tampón TBS [Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM y NaCl 150 mM] antes de comenzar las incubaciones; a continuación, se bloquearon los radicales libres con tampón TBSL [100 ml de tampón TBS y 5 g de leche descremada] durante 1 h a 37°C en agitación. Tras ello, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario, anti-IL-1 β de ratón [anti-mouse IL-1 β (R&D Systems)], en una dilución 1/500 en tampón TBSL durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con tampón TBS y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG marcado con peroxidasa (anti-IgG-HRP) diluido 1/20.000 en tampón TBSL durante 1 h a temperatura ambiente. Por último, las membranas fueron lavadas durante 10 minutos, tres veces, con tampón TBS y la reacción fue visualizada mediante quimioluminiscencia con el reactivo Immobilon western (Millipore) sobre láminas de película Curix RP-2 (Kodak).

1.15 Análisis informático de imágenes

El análisis informático de las electroforesis de las distintas fracciones purificadas se realizó con el programa informático ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare) a partir de geles teñidos con azul Coomassie G250, con tinción de plata o revelados con quimioluminiscencia.

2. Resultados

2.1 Obtención de la proteína CaKre9 recombinante

Debido a la estrategia seguida para la producción y expresión de la proteína Kre9 de *C. albicans* recombinante [CaKre9 recombinante], basada en el empleo del plásmido pET-Blue y de *E. coli*, dicha proteína CaKre9 recombinante se obtuvo en forma de una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la proteína Kre9 de *C. albicans* (CaKre9) fusionada a una cola de HSV y 6 restos de histidina [(His)₆]; por tanto, el empleo de los términos “proteína CaKre9 recombinante” y “proteína de fusión CaKre9-(His)₆” en los ejemplos para referirse a la proteína recombinante producida es equivalente.

La secuencia nucleotídica de la proteína CaKre9 que se amplificó constaba de 834 pb. El vector de clonación y expresión fue el plásmido comercial pET-Blue (Novagen). Mediante los iniciadores diseñados que contenían los sitios de restricción para EcoRI y PstI, se amplificó la secuencia nucleotídica de dicha proteína CaKre9. La construcción se denominó pET-KRE9. Dicha secuencia nucleotídica de la proteína CaKre9 se introdujo en el plásmido respetando la pauta de lectura del mismo, con lo que la proteína recombinante se expresó con la cola HSV-His (Figura 1).

Tras la transformación de las células Novablue con la construcción pET-KRE9 y para detectar los clones positivos, se realizó un rastreo rápido de las colonias que aparecían de color blanco o azul claro. Se eligieron 3 de los clones tomados como positivos para hacer una preparación del DNA plasmídico y digerirlo con sus respectivos enzimas de restricción para comprobar el tamaño del inserto.

Estos clones fueron seleccionados, y los plásmidos recombinantes se secuenciaron para determinar si el inserto había sido clonado en la pauta de lectura correcta y su secuencia era la deseada. La secuenciación se realizó en el Servicio de Genómica de la UPV/EHU.

Una vez comprobado el tamaño y la secuencia del inserto, se procedió a la transformación de células Tuner (Novagen) con uno de los clones seleccionados. Se analizó la expresión de la proteína mediante geles de SDS-PAGE de la cepa recombinante inducida y sin inducir. Como control negativo se empleó la cepa transformada con el plásmido pET-Blue. La tinción con azul de Coomassie no reveló la sobreexpresión de ninguna proteína; sin embargo, la utilización del anticuerpo anti-HSV detectó la presencia de una proteína de fusión de 45 kDa aproximadamente (Figura 2).

Tras su purificación mediante cromatografía de afinidad en columnas His Bind (Novagen), que retienen las proteínas que poseen colas de entre 6 y 10 histidinas, se procedió de nuevo a la comprobación mediante SDS-PAGE de la presencia de la misma. Como se puede observar en la Figura 2, la purificación resultó satisfactoria ya que se pudo comprobar su presencia mediante tinción azul de Coomassie y mediante Western Blot frente al anticuerpo HSV.

Por último, se analizó la proteína CaKre9 recombinante para ver si todavía poseía la capacidad de ser reconocida por el anticuerpo anti-IL-1 β . El resultado mostrado en la Figura 2 demuestra que la proteína de fusión obtenida (CaKre9) también es reconocida por el anticuerpo anti-IL-1 β como la proteína Kre9 nativa de *C. albicans*. Por tanto, la proteína de fusión obtenida en *E. coli* a partir del gen KRE9 de *C. albicans* (CaKre9) mantiene la capacidad de unión con el anticuerpo anti-IL-1 β bloqueante de su función.

3. Discusión

Estudios previos realizados por los inventores, que constituyen el objeto de la solicitud de patente española copendiente nº P200900907 titulada “Composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la metástasis”, presentada el 2 de abril de 2009, a nombre de la Universidad del País Vasco y Pharmakine, S.L., han puesto de manifiesto la importancia de la IL-1 β en el proceso iniciado por las manoproteínas de *C. albicans*, que inducen un aumento de la adhesión tumoral al ESH e indican la posible presencia en la fracción manoproteica de una molécula capaz de actuar en el lugar de la IL-1 β . Para detectar una manoproteína que se une al receptor de la IL-1 β activándolo e intensificando más la respuesta del endotelio, se utilizó un anticuerpo anti-IL-1 β de ratón. Este anticuerpo se generó frente a una IL-1 β de ratón recombinante producida en *E. coli* capaz de neutralizar la función biológica de la IL-1 β , es decir, se une a la parte proteica y evita que la molécula se una al receptor. Se realizaron Western Blot bidimensionales de la fracción manoproteica purificada de *C. albicans* evaluados frente al anticuerpo anti-IL-1 β y revelados con quimioluminiscencia. En los resultados de las inmunodetecciones realizadas se observó una reacción no muy intensa pero muy específica de una zona de aproximadamente 47-50 kDa y punto isoelectrónico de 5,3, lo que indica la existencia de una manoproteína de *C. albicans* que es reconocida por un anticuerpo anti-IL-1 β en las fracciones manoproteicas que mayor aumento de la adhesión tumoral habían inducido.

La identificación de dicha manoproteína podría suponer la identificación de un efector de *C. albicans* que estimule el endotelio y, por consiguiente, aumente la adhesión tumoral. A la vista de los resultados obtenidos, se procedió a la secuenciación de la manoproteína reconocida por el anticuerpo anti-IL-1 β mediante LC-MS/MS (esta técnica permite identificar proteínas a través de la secuenciación de sus péptidos y permite analizar mezclas complejas de proteínas sin necesidad de fraccionarlas previamente). Los resultados obtenidos mediante la secuenciación LC-MS/MS indican que la manoproteína reconocida por el anticuerpo anti-IL-1 β de ratón es la proteína Kre9 de *C. albicans*. El gen KRE9 de *C. albicans* codifica una proteína similar al producto del gen KRE9 de *S. cerevisiae*. Su secuencia se compone de un ORF de 813 pb que codifica una proteína de 29 kDa formada por 271 aminoácidos. La región hidrofóbica N-terminal es una secuencia señal aproximadamente hasta el punto de unión entre el aminoácido 21 y 22. Contiene una zona central rica en residuos de serina y treonina característicos de una potencial O-glicosilación, típica de muchas manoproteínas de pared. Según el grupo de Lussier (Lussier *et al.*, Proc Natl Acad Sci. 1998; 95:9825-9830) la disrupción del gen KRE9 de *C. albicans* muestra que la Kre9 es requerida para la síntesis o ensamblaje de los β -1,6-glucanos. Las células mutantes homocigotas de *C. albicans* para el gen KRE9 crecen pobremente en galactosa y no son capaces de filantar en suero y en medios que contienen glucosa el gen resulta esencial. Además de por estos dos motivos, dichos autores apuntan al producto del gen KRE9 como un candidato útil para ser diana de drogas específicas contra hongos porque el gen no ha sido encontrado en los genomas de bacterias ni de arqueobacterias secuenciados y parece estar ausente también en metazoos, y porque los datos disponibles sugieren que su localización es la superficie celular, en cuyo caso un inhibidor de la Kre9 no necesitaría entrar en la célula fúngica para ser efectivo, reduciendo además de este modo el riesgo de que aparezcan cepas resistentes.

Para confirmar que efectivamente la proteína Kre9 de *C. albicans* (CaKre9) está implicada en la estimulación del endotelio que da como resultado el aumento de la adhesión tumoral al mismo, se procedió a su clonación, expresión y purificación como proteína recombinante. El plásmido pET-Blue fue elegido como vector dadas las ventajas que ofrece en cuanto a que además de ser un vector de expresión facilita la selección de colonias recombinantes con inserto a través del sistema basado en el operón lactosa y a que presenta dos secuencias consecutivas que codifican para una cola HSV para la inmunodetección y una cola de polihistidinas para la purificación. La proteína CaKre9 recombinante se clonó y se sobreexpresó en *E. coli*, detectándose mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-HSV la proteína con un peso molecular de aproximadamente 45 kDa. La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad en columna en base a la cola de histidinas y los resultados tras la purificación evidenciaron un correcto proceso de purificación, tras el cual se puede visualizar en electroforesis ID mediante tinción con Coomassie una banda que además mantiene su capacidad de unión al anticuerpo anti IL-1 β , como puede comprobarse al realizar inmunoblot. Dicha proteína CaKre9 recombinante purificada fue utilizada para estimular el endotelio y observar su efecto en la adhesión tumoral (Ejemplo 2).

Ejemplo 2

Efecto de la CaKre9 expresada en E. coli en la adhesión tumoral al endotelio hepático

1. Materiales y Métodos

1.1 Proteína CaKre9 recombinante

La proteína CaKre9 recombinante utilizada en este ensayo fue la obtenida según el Ejemplo 1, en ocasiones también identificada como “proteína de fusión CaKre9-(His)₆”.

1.2 Células de melanoma B16

El melanoma B16 (MB16) es un tumor maligno muy indiferenciado que fue aislado en los Laboratorios Jackson (Maine, EEUU) en 1954, de un tumor espontáneo surgido en la piel de un ratón de la cepa C57BL/6J. En 1972, partiendo de esta línea IJ Fidler obtuvo variantes celulares con diferente potencial metastático mediante implantes reiterados por vía intravenosa de las células tumorales obtenidas de los focos metastáticos pulmonares. De este modo se seleccionó una línea con gran capacidad metastático que se conoce como B16F10 (Fidler IJ. Nature. 1973; 242:148-149). Este tumor fue facilitado por la American Type Culture Collection (ATCC CRL 6323).

Las células del melanoma B16 fueron cultivadas en medio modificado de Eagle de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 μ g/ml estreptomina. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

1.3 Células del ESH

El hígado de ratones anestesiados fue perfundido a través de la vena portal con la solución salina de Gey (GBSS) (pH 7,4) a 1,5 ml/min durante 3 minutos. Después, la digestión del tejido fue llevada a cabo mediante perfusión *in situ* con 10 ml de solución A (10 ml de GBSS 10 ml y Pronasa al 0,1%) seguido de 15 ml de solución B (15 ml de GBSS, Colagenasa al 0,083% (p/v) y Pronasa al 0,033% (p/v)). El hígado fue entonces troceado y mezclado en 13 ml de solución C (13 ml de GBSS, Colagenasa al 0,038%, Pronasa al 0,038% y DNasa I al 0,0005% (p/v)) a 37°C

ES 2 372 103 A1

durante 10 minutos. Tras esta última digestión enzimática se diluyó la solución con GBSS y se filtró todo el volumen a través de una gasa de nylon estéril. El filtrado se repartió en dos tubos de 50 ml y se centrifugó a 1.500 rpm durante 7 minutos a 4°C. Se realizó un segundo lavado en las mismas condiciones. La suspensión celular fue centrifugada a 800 g durante 15 minutos en solución de metrizamida (2-(3-acetamida-5-metilacetamida-2,4,6-triodobenzamida)-2-desoxi-D-glucosa) (10 ml de GBSS 10 ml y metrizamida al 17,5%). A continuación, se recogieron las células situadas en la parte superior del gradiente, se resuspendieron en DMEM-HEPES (10 mM, pH 7,4) y se centrifugaron a 500 g durante 7 minutos a 4°C. El pellet celular obtenido se resuspendió en un pequeño volumen de DMEM para calcular la proporción de células viable mediante un test de exclusión con azul tripan y conteo con hemocitómetro. Para obtener una población de células sinusoidales en condiciones óptimas, se sembraron sobre una matriz de colágeno tipo I al 1 %.

Para la preparación de estas placas de cultivo con esta matriz se utilizaron placas de 24 pocillos a las que se añadió la solución de colágeno a razón de 1 ml/pocillo. Tras su incubación a 37°C durante al menos 2 h, las células aisladas se lavaron y se sembraron directamente. Las células endoteliales recién aisladas en DMEM con 10% de SBF fueron añadidas a placas de 24 pocillos bloqueadas con colágeno tipo I a razón de 10⁶ cél/ml por pocillo, y 2 h después fueron lavadas. Los cultivos resultantes de células adherentes del ESH fueron considerados como puros ya que los otros tipos celulares se terminaron de eliminar en los lavados. Los cultivos de células del ESH fueron estabilizados y mantenidos en medio DMEM libre de pirógenos suplementado con suero bovino fetal al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 µg/ml estreptomina a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante al menos 12 h. Después de su puesta en cultivo, las células endoteliales se lavaron y se mantuvieron en medio sin suero durante al menos 4 h antes de realizar cualquier tipo de ensayo. En estas condiciones, las células endoteliales se pudieron mantener en cultivo durante 4-5 días como máximo, a partir de los cuales comenzaron a perder características.

1.4 Adhesión tumoral inducida por la proteína CaKre9 recombinante

La medida de la adhesión tumoral inducida por la proteína CaKre9 recombinante expresada en *E. coli* se llevó a cabo utilizando el método basado en la medida de la fluorescencia. Las células del MB16 fueron resuspendidas en una disolución de 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5,6-carboxifluoresceín acetoximetil éster (BCECF-AM) en DMEM-HEPES (40 µg/ml) y fueron incubadas durante 20 minutos a 37°C. A continuación, las células fueron lavadas y resuspendidas en DMEM-HEPES a una concentración de 2 x 10⁵ cél/ml y se determinó la autofluorescencia del cultivo de ESH. Posteriormente, las células del ESH fueron incubadas con la proteína CaKre9 recombinante, a diferentes concentraciones (1, 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1.000 y 2.000 ng/ml), durante 8 h. Las células del ESH no tratadas recibieron medio basal como control. Después de lavadas extensamente, las células MB16 marcadas con BCECF fueron añadidas al cultivo de células del ESH (0,1 ml/pocillo) y también a plástico o a pocillos control cubiertos con colágeno tipo I.

Una vez transcurrido el tiempo de adhesión, se excitaron los co-cultivos con luz de 488 nm de longitud de onda y se registró la fluorescencia emitida a 530 nm por la BCECF incorporada a las células tumorales en un fluorímetro de barrido en placa. A continuación, se realizaron 3 lavados enérgicos de dichos co-cultivos, eliminando las células tumorales no adheridas a la monocapa de células endoteliales. A continuación, se añadió 1 ml del mismo medio de adhesión en cada pocillo y se procedió a la lectura de la fluorescencia emitida. De este modo se pudo determinar un valor relativo (en unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia) con respecto al número de células tumorales añadidas. La adhesión relativa fue calculada para cada pocillo según la fórmula:

$$\text{Adhesión relativa} = (A - C)/(B - C)$$

donde

A es la fluorescencia de las células del MB16 adheridas al ESH incubado con la proteína CaKre9 recombinante;

B es la fluorescencia de las células del MB16 adheridas a las células del ESH no tratadas; y

C es la fluorescencia anterior a la adhesión de células tumorales.

2. Resultados

Se realizó un ensayo de adhesión de células tumorales al endotelio hepático incubado con diferentes concentraciones de la proteína CaKre9 recombinante [proteína de fusión CaKre9-(His)₆], con el fin de analizar el efecto de dicha proteína de fusión.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3, donde puede apreciarse el efecto de dicha proteína CaKre9 recombinante sobre el aumento de la adhesión de células del B16M al ESH. Como puede apreciarse en dicha Figura 3, el aumento de la adhesión tumoral inducido por la proteína CaKre9 recombinante varía dependiendo de la concentración de proteína utilizada, en un comportamiento típico que podría compararse con el de algunas citocinas. La proteína CaKre9 recombinante, a una concentración de 5 ng/ml, llegó a inducir un aumento de más del 150% de la adhesión tumoral (células de B16M) al ESH con respecto al control. Este efecto supuso la adhesión de un número de células tumorales en ocasiones cercano al 100% de las células utilizadas en el ensayo. Sin embargo, a concentraciones más elevadas el efecto disminuyó.

Por tanto, el aumento de la adhesión tumoral al ESH estimulado por la proteína CaKre9 recombinante fue espectacular, más aún, teniendo en cuenta que se trata de una proteína de fusión [CaKre9-(His)₆] expresada en *E. coli*, la cual no posee ningún manano adherido a dicha proteína. Esta situación provoca que dicha proteína de fusión sea incapaz de estimular el receptor de mañosa, y, por consiguiente, desencadenar la cascada de citocinas tras su estimulación, lo que parece corroborar la existencia de una vía inflamatoria distinta a la que se estimula mediante la unión al receptor de mañosa; dicha vía alternativa puede ser iniciada en respuesta a proteínas de *C. albicans* y también induce un aumento de la adhesión tumoral al endotelio hepático. En esta respuesta está implicada la proteína CaKre9 recombinante ya que actúa aumentando la adhesión tumoral al endotelio probablemente mimetizando la acción de alguna citocina proinflamatoria como la IL-1 β . Este aumento de la adhesión tumoral al ESH incubado con la proteína CaKre9 recombinante, que no posee carbohidratos adheridos, pone de manifiesto la importancia de la parte proteica de las manoproteínas, demostrando que no solo el receptor de mañosa está implicado en este proceso.

Este ensayo también pone de manifiesto que la proteína CaKre9 recombinante, así como la proteína Kre9 de *C. albicans* (CaKre9), actúa uniéndose al receptor de la IL-1 β y tiene un alto potencial proinflamatorio debido a su capacidad de unión y activación del receptor de la IL-1 β , actuando como si tratara de la propia IL-1 β endógena, una de las citocinas proinflamatorias más importantes de la respuesta inmune.

3. Discusión

La proteína CaKre9 recombinante purificada (Ejemplo 1) fue utilizada para estimular el endotelio y observar su efecto en la adhesión tumoral. Este ensayo demuestra inequívocamente la implicación de la proteína CaKre9 en el aumento de la adhesión de células tumorales al endotelio ya que se induce un aumento significativo de la adhesión de células tumorales al endotelio estimulado con la CaKre9 recombinante con respecto al endotelio no estimulado. Aunque la proteína CaKre9 se expresa a niveles de concentración muy bajos, es capaz de inducir un aumento significativo de la adhesión tumoral a concentraciones inferiores a 10 ng/ml. A pesar de ello, el efecto disminuye cuando las concentraciones de esta proteína son superiores a esa concentración.

Dado que dicha proteína CaKre9 recombinante ha sido obtenida en forma de una proteína de fusión [CaKre9-(His)₆] y expresada en *E. coli*, carece de la manosilación característica cuando se expresa en su forma nativa en *C. albicans* y no podría ser capaz de estimular los receptores de mañosa. Sin embargo, esta proteína es capaz de desencadenar una respuesta inflamatoria que induce un espectacular aumento de la adhesión tumoral al endotelio, llegando a inducir la unión de cifras cercanas al 100% de las células tumorales utilizadas cuando el endotelio se estimula con una concentración de 5 ng/ml de proteína CaKre9 recombinante. Este resultado supone un incremento de células tumorales adheridas al endotelio de más del 150% con respecto a la situación control. Este ensayo parece confirmar la existencia de una vía alternativa a la iniciada por el receptor de mañosa que se activa en respuesta a proteínas de *C. albicans*. En este caso posiblemente vía receptor de la IL-1 β .

La existencia de una respuesta inmune en el endotelio sinusoidal hepático (ESH) frente a *C. albicans* alternativa a la desencadenada a partir de la unión al receptor de mañosa, reduciendo significativamente pero no totalmente el aumento de la adhesión tumoral inducido por *C. albicans* y sus manoproteínas, junto con la capacidad de la proteína CaKre9 recombinante de aumentar la adhesión tumoral al endotelio demuestra la existencia de otra vía. En el modelo aquí estudiado, dicha vía alternativa puede ser una respuesta inflamatoria del endotelio frente a antígenos extraños como los de *C. albicans* ya que las células del ESH poseen capacidad para funcionar como células presentadoras de antígenos. En este sentido cabe destacar que la manoproteína Kre9 de *C. albicans* no ha sido descrita previamente como antígeno. Además, hay que tener en cuenta que dicha manoproteína CaKre9 se une al anticuerpo anti-IL-1 β murino y, por tanto, puede que estimule directamente el receptor de la IL-1 β del endotelio, iniciando de esa forma la respuesta inflamatoria en ese punto o reforzando la iniciada por otras manoproteínas sobre el receptor de mañosa u otros receptores. Por otro lado, hay que considerar, que la adhesión tumoral sobre el endotelio estimulado por la CaKre9 es muy alta a concentraciones bajas de dicha proteína, mientras que a medida que se aumenta su concentración se reduce el efecto. Un efecto similar se encuentra en las citocinas, ya que su capacidad autorreguladora las impide mantener su actividad a elevadas concentraciones para no dañar a los tejidos. En el caso de la CaKre9, los inventores han comprobado que dicha proteína se expresa en *C. albicans* en concentraciones muy bajas ya que solo se logró detectar dicha manoproteína mediante inmunodetección utilizando el anticuerpo anti-IL-1 β y revelando con quimioluminiscencia.

La proteína Kre9 de *C. albicans* actúa presuntamente uniéndose al receptor de la IL-1 β , y tiene un alto potencial proinflamatorio debido a su capacidad de unión y activación del receptor, actuando como si se tratara de la propia IL-1 β endógena, una de las citocinas proinflamatorias más importantes de la respuesta inmune.

En resumen, en este ejemplo se demuestra que la proteína CaKre9 induce una respuesta proinflamatoria mediada por citocinas proinflamatorias (e.g., IL-1 β , etc.) en el ESH que favorece la adhesión de células tumorales a dicho endotelio. La IL-1 β es una citocina crucial en dicho proceso y su bloqueo inhibe completamente la adhesión tumoral. Este ejemplo pone de manifiesto que la proteína CaKre9 recombinante es reconocida por un anticuerpo que reconoce y bloquea la IL-1 β ; asimismo, ilustra que la proteína CaKre9 recombinante estimula significativamente la adhesión tumoral al ESH a concentraciones muy bajas.

ES 2 372 103 A1

Aunque el receptor de mañosa está implicado en la activación de gran parte de la respuesta proinflamatoria del endotelio frente a *C. albicans* que desencadena un aumento de la adhesión tumoral, el endotelio también se estimula con proteínas recombinantes carentes de manano (e.g., CaKre9 recombinante), lo que demuestra la existencia de otras vías de estimulación.

5

En conclusión, la diseminación hematológica de *C. albicans* o sus manoproteínas puede aumentar el riesgo de sufrir la implantación de células tumorales en el endotelio hepático a través de una reacción proinflamatoria. Esta reacción se da principalmente a través de la estimulación del receptor de mañosa, pero también intervienen efectores de *C. albicans*, tales como la manoproteína Kre9, que actúan sobre otros receptores endoteliales. Por tanto, es posible afirmar que células de *C. albicans* o algunas de sus manoproteínas en presencia de células tumorales favorecerían un proceso de implantación tumoral o metastático en el hígado.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una proteína, no glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio.

2. Proteína según la reivindicación 1, en donde dicha proteína es la proteína Kre9, no glicosilada, de una especie del género *Candida* (*Candida* spp.).

10 3. Un organismo procarionta que comprende un polinucleótido que codifica para una proteína, no glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, según la reivindicación 1.

15 4. Organismo según la reivindicación 3, que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.

5. Organismo según la reivindicación 3 ó 4, en donde dicho organismo es una bacteria.

20 6. Organismo según la reivindicación 5, en donde dicho organismo es *Escherichia coli*.

25 7. Un procedimiento para la obtención de una proteína, no glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, según la reivindicación 1, que comprende cultivar un organismo procarionta según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, bajo condiciones que permiten la producción de dicha proteína, variante o fragmento, y, si se desea, recuperar dicha proteína no glicosilada, variante o fragmento de la misma.

30 8. Un método *in vitro* para identificar un compuesto potencialmente útil para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a la adhesión de células tumorales al endotelio, que comprende:

35 a) poner en contacto una célula que expresa un receptor de IL-1 β al que se une, o con el que interactúa, una proteína, no glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, según la reivindicación 1, con una proteína, no glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, según la reivindicación 1, y con el compuesto candidato, y

40 b) identificar aquellos compuestos que inhiben la unión de dicha proteína no glicosilada a dicho receptor de IL-1 β .

45 9. Empleo de un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína, no glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, según la reivindicación 1, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a la adhesión de células tumorales al endotelio.

50 10. Empleo según la reivindicación 9, en el que dicha enfermedad asociada con la adhesión de células tumorales al endotelio es metástasis.

55 11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína, no glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, según la reivindicación 1, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

60 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, que comprende, además un fármaco adicional útil en el tratamiento de una enfermedad asociada a una proliferación y/o adhesión de células tumorales al endotelio.

65 13. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína, no glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, según la reivindicación 1, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

ES 2 372 103 A1

14. Composición farmacéutica según la reivindicación 13, que comprende, además un fármaco adicional útil en el tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso.

5 15. Un método *in vitro* para identificar un compuesto potencialmente útil para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a la adhesión de células tumorales al endotelio, que comprende:

- 10 a) poner en contacto una célula que expresa un receptor de IL-1 β al que se une, o con el que interactúa, una proteína, glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, con una proteína, glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, y con el compuesto candidato, y
- 15 b) identificar aquellos compuestos que inhiben la unión de dicha proteína glicosilada a dicho receptor de IL-1 β .

20 16. Empleo de un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína, glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a la adhesión de células tumorales al endotelio.

25 17. Empleo según la reivindicación 16, en el que dicha enfermedad asociada con la adhesión de células tumorales al endotelio es metástasis.

30 18. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína, glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

19. Composición farmacéutica según la reivindicación 18, que comprende, además un fármaco adicional útil en el tratamiento de una enfermedad asociada a una proliferación y/o adhesión de células tumorales al endotelio.

35 20. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína, glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

40 21. Composición farmacéutica según la reivindicación 20, que comprende, además un fármaco adicional útil en el tratamiento de una enfermedad causada por un agente infeccioso.

45 22. Uso de un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína, glicosilada, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a la adhesión de células tumorales al endotelio.

50

55

60

65

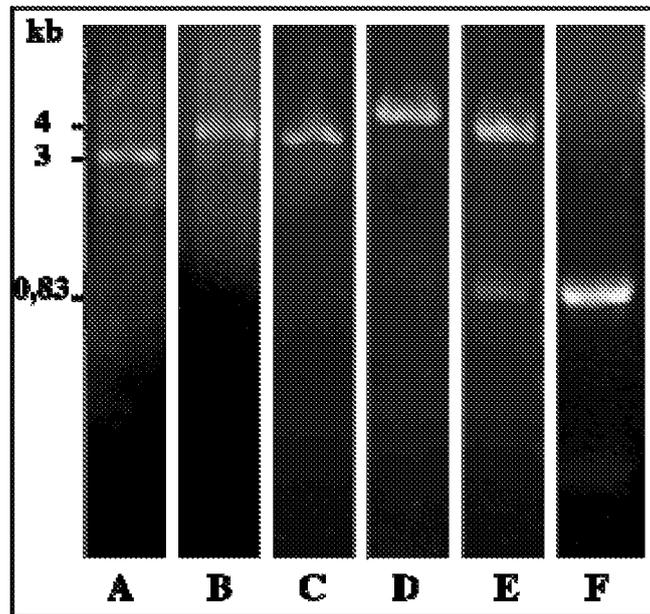


Figura 1

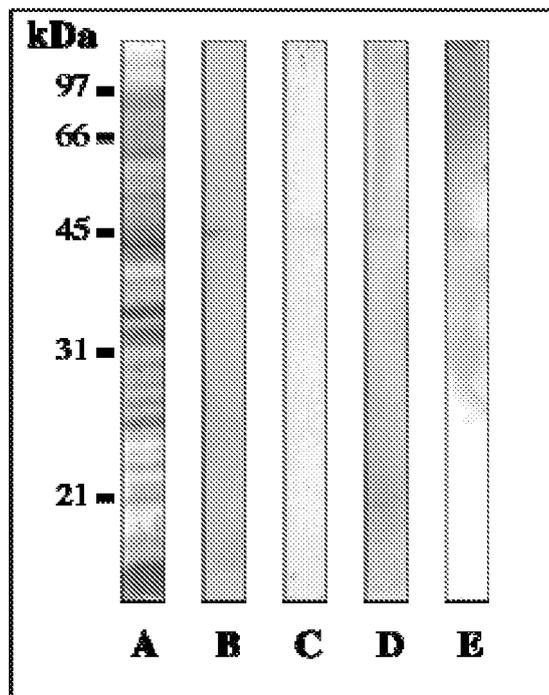


Figura 2

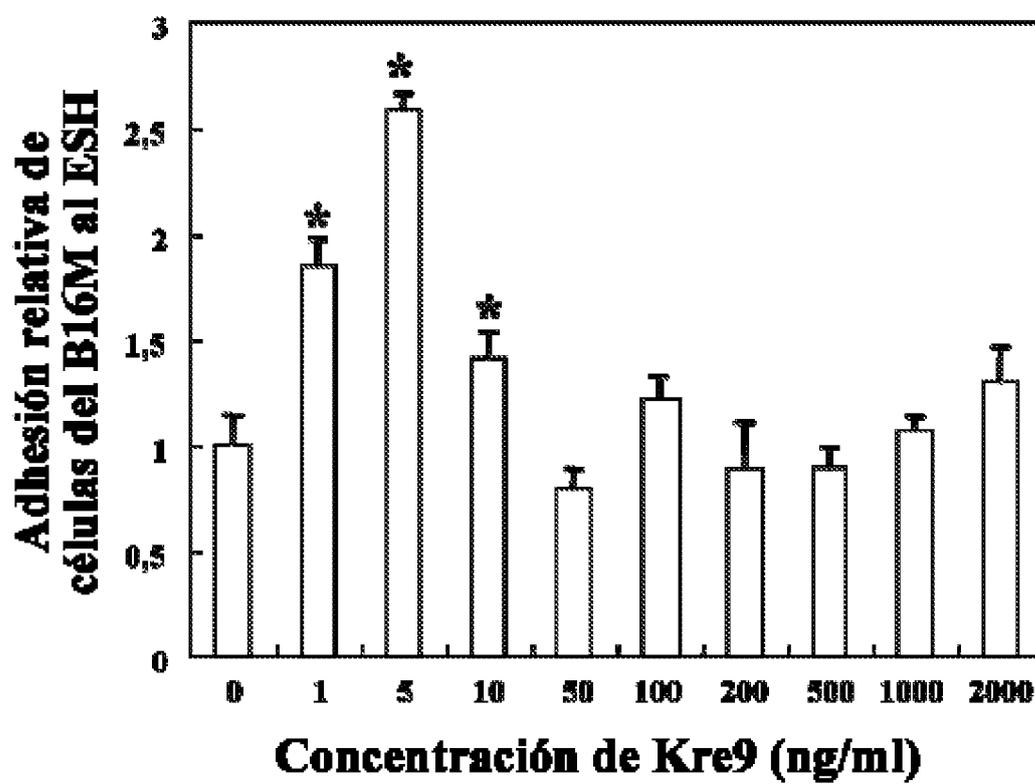


Figura 3

TATTTGCTTTAAAGATATCGGATACTTTTTTTTCCTTTTGAGTTTTGTTTTGTT
TTGTTTTATTTAGATTAGTTTCTATTTTTTAATTAATATTCTACATTCGTTATT
GACGACTACAACATATCAACGACCTAGCACATCCACCCACCAAGATAACAC
AACTACAATCTATCAGACACATCTAGCAAAATGAGACAATTTCAAATCATA
TTAATTTCCCTTGTTGTTTCCATAATAAGATGTGTTGTTGCAGATGTTGACAT
CACATCACCAAAGAGTGGAGAACTTTTTCTGGTAGTTCTGGATCAGCAAGT
ATCAAGATTACCTGGGATGATTCAGACGATTCAGACTCACCGAAATCTTTGGA
TAATGCCAAAGGGTACACAATTTCTTTATGTACTGGACCTACTTCAGATGGGG
ATATCCAGTGTTTGGATCCATTAGTCAAGAACGAAGCTATTTCAAGGTAATCT
AAAACAGTTTCCATTGCCCAGAACTCAGTACCTAATGGTTATTACTATTTCCA
AATTTACGTTACTTTCACTAATGGAGGTACCACTATTCATTATTCACCACGTTT
CAAATTGACTGGTATGTCTGGTCCAAGTCCACTTTAGATGTCACCGAAACAG
GATCAGTGCCAGCGGATCAAGCTTCAGGATTTGATACTGCAACTACTGCTGA
CTCCAAATCTTTCACAGTTCCATATACCCTACAAACAGGGAAGACTAGATACG
CACCAATGCAAATGCAACCAGGTACCAAAGTGACTGCTACAACCTGGAGTAT
GAAGTTCCCAACTAGTGCTGTTACTTACTACTCAACAAAGGCTGGCACACCAA
ATGTGGCCTCTACTATTACCCAGGTTGGAGTTATACTGCTGAATCTGCCGTT
AACTATGCTAGTGTTGCGCCATATCCAACATACTGGTATCCTGCCAGTGAACG
AGTGAGTAAGGCTACAATTAGTGCTGCTACAAAGAGAGAAGAAGATGGTTGG
ATTGAATGAGGGAAACGGTGCTTATAACTTAGATAATGCTAACATTGGATT
TCATTTTTCAATTTTTTTTTGTTTGGTTTAGTTTGTATTAGCTTGTTCAATAA
CATACAGATCCAAGCTCAGCTCAAGACACAAGCAAAAAGAC

Figura 4

ES 2 372 103 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad del País Vasco

5 <120> Compuestos estimuladores de la adhesión celular indeseada y sus aplicaciones

<130> P4813ES00

10 <160> 5

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 271

<212> PRT

20 <213> *Candida albicans*

<400> 1

25 Met Arg Gln Phe Gln Ile Ile Leu Ile Ser Leu Val Val Ser Ile Ile
1 5 10 15
Arg Cys Val Val Ala Asp Val Asp Ile Thr Ser Pro Lys Ser Gly Glu
20 25 30
Thr Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Lys Ile Thr Trp Asp
35 40 45
30 Asp Ser Asp Asp Ser Asp Ser Pro Lys Ser Leu Asp Asn Ala Lys Gly
50 55 60
Tyr Thr Ile Ser Leu Cys Thr Gly Pro Thr Ser Asp Gly Asp Ile Gln
65 70 75 80
35 Cys Leu Asp Pro Leu Val Lys Asn Glu Ala Ile Ser Gly Lys Ser Lys
85 90 95
Thr Val Ser Ile Ala Gln Asn Ser Val Pro Asn Gly Tyr Tyr Tyr Phe
100 105 110
40 Gln Ile Tyr Val Thr Phe Thr Asn Gly Gly Thr Thr Ile His Tyr Ser
115 120 125
Pro Arg Phe Lys Leu Thr Gly Met Ser Gly Pro Thr Ala Thr Leu Asp
130 135 140
45 Val Thr Glu Thr Gly Ser Val Pro Ala Asp Gln Ala Ser Gly Phe Asp
145 150 155 160
Thr Ala Thr Thr Ala Asp Ser Lys Ser Phe Thr Val Pro Tyr Thr Leu
165 170 175
Gln Thr Gly Lys Thr Arg Tyr Ala Pro Met Gln Met Gln Pro Gly Thr
180 185 190
Lys Val Thr Ala Thr Thr Trp Ser Met Lys Phe Pro Thr Ser Ala Val
195 200 205
50 Thr Tyr Tyr Ser Thr Lys Ala Gly Thr Pro Asn Val Ala Ser Thr Ile
210 215 220
Thr Pro Gly Trp Ser Tyr Thr Ala Glu Ser Ala Val Asn Tyr Ala Ser
225 230 235 240
55 Val Ala Pro Tyr Pro Thr Tyr Trp Tyr Pro Ala Ser Glu Arg Val Ser
245 250 255
Lys Ala Thr Ile Ser Ala Ala Thr Lys Arg Arg Arg Trp Leu Asp
260 265 270

60 <210> 2

<211> 816

<212> DNA

65 <213> *Candida albicans*

ES 2 372 103 A1

<400> 2

	atgagacaat	ttcaaatcat	attaatttcc	cttgttgttt	ccataataag	atgtggtggt	60
	gcagatggtg	acatcacatc	accaaagagt	ggagaaactt	tttctggtag	ttctggatca	120
5	gcaagtatca	agattacctg	ggatgattca	gacgattcag	actcaccgaa	atctttggat	180
	aatgccaaag	ggtacacaat	ttctttatgt	actggaccta	cttcagatgg	ggatatccag	240
	tgtttgatc	cattagtcaa	gaacgaagct	atttcaggta	aatctaaaac	agtttccatt	300
	gcccagaact	cagtacctaa	tggttattac	tatttccaaa	tttacgttac	tttactaat	360
	ggaggtagca	ctattcatta	ttcaccacgt	ttcaaattga	ctgggatgtc	tggtccaact	420
10	gccactttag	atgtcaccga	aacaggatca	gtgccagcgg	atcaagcttc	aggatttgat	480
	actgcaacta	ctgctgactc	caaatctttc	acagttccat	ataccctaca	aacagggag	540
	actagatagc	caccaatgca	aatgcaacca	ggtaccaaag	tgactgctac	aacctggagt	600
	atgaagttcc	caactagtgc	tgttacttac	tactcaacaa	aggtctggc	accaaatgtg	660
	gcctctacta	ttaccccagg	ttggagttat	actgctgaat	ctgccgtaa	ctatgctagt	720
15	gttgcgcat	atccaacata	ctggtatcct	gccagtgaac	gagtgagtaa	ggctacaatt	780
	agtgtgcta	caaagagaag	aagatggttg	gattga			816

<210> 3

20 <211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25 <220>

<223> cebador directo

<400> 3

30

aaccggaatt cgctatcaga cacatctagc aaa 33

<210> 4

35

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> cebador inverso

45 <400> 4

tcctctctgc agatccaacc atcttcttct c 31

50 <210> 5

<211> 1145

<212> DNA

55

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Secuencia amplificada

60

65

ES 2 372 103 A1

<400> 5

	tatttgcttt	aaagatatcg	gatacttttt	tttccttttg	agttttgttt	tgttttgttt	60
5	tatttagatt	agtttctatt	tttaattaat	attctacatt	cgttattgac	gactacaaca	120
	tatcaacgac	ctagcacatc	cacccaccaa	gataacacaa	ctacaatcta	tcagacacat	180
	ctagcaaaat	gagacaatth	caaatcata	taatthccct	tgthgthtcc	ataataagat	240
	gtgthgthg	agatgthgac	atcacatcac	caaagagthg	agaaacttht	tctgthgtht	300
	ctgthgacg	aagthtcaag	attacctgth	atgthtcaag	cgthtcaagc	tcacchgaat	360
10	ctthgthgaa	tgchaaagth	tacacaatth	ctthtathgac	thgacctact	tcagatgthg	420
	atatccagth	thtgthtcca	thtagthcaag	acgaagctat	thcagthaaa	tctaaaacag	480
	thtccathg	ccagaaactca	gtacctaatg	gthtattacta	thtccaaatth	tacgthtactt	540
	tcactaatg	agthtaccact	atthcattatt	cacchagtht	caaathgact	gthtathgctg	600
	gtchaaactg	cactthtagat	gtcacchgaat	cagthtcaag	gchcagchgat	caagctthcag	660
15	gaththgath	tgcaactact	gthgactcca	aatctthcac	agthtccatth	accttacaat	720
	cagthgaagc	thgathacgca	ccaathgcaat	thgcaaccag	tacchaaagth	actgcttaca	780
	cctgthgath	gaagthtcca	actagthgctg	thtacttacta	ctcaacaaag	gctgthcacac	840
	caaathgthg	ctctactatt	acctcagtht	gthgthtatac	thgctgaatct	gchgthtact	900
	atgctagthg	thgchccatth	ccaacatact	gthtathctg	cagthgaacga	gthgagthaa	960
20	ctacaathg	thgctgctaca	aagagaaag	gathgthtga	thtgaathgag	gaaacgthg	1020
	thtataactth	gathaatgct	acathgthg	tcaththtca	thtthththt	thtggthttag	1080
	thtghthtatt	agctthgthtca	ataacataca	gathccaagct	cagctcaaga	cacaagcaat	1140
	aagac						1145

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200900908

②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.04.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	26.04.2005, Base de datos EBI [en línea] [recuperado el 13.05.2010] Recuperado de: http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[uniprot-id:Q5ANN9_CANAL][uniprot-acc:Q5ANN9_CANAL]	1-7,11-14,18-21
X	US 7241613 B1 (WILLINS et al.) 10.07.2007, todo el documento.	1-7,11-14,18-21
X	LUSSIER M. et al. The <i>Candida albicans</i> KRE9 gene is required for cell wall β -1,6-glucan synthesis and is essential for growth on glucose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 08.1998, Vol. 95, páginas 9825-9830, todo el documento.	1-7,11-14,18-21
X	WO 9931269 A2 (MCGILL UNIVERSITY) 24.06.1999, todo el documento.	1-7,11-14,18-21
X	WO 02053728 A2 (ELITRA PHARMACEUTICALS INC) 11.07.2002, todo el documento.	1-7,11-14,18-21
A	OROZCO A. S. et al. Mechanisms of the proinflammatory response of endothelial cells to <i>Candida albicans</i> infection. Infection and Immunity. 03.2000, Vol. 68, Nº 3, páginas 1134-1141, ISSN 0019-9567/00, todo el documento.	1-22
A	POLONELLI L. et al. Antibody Complementarity-Determining Regions (CDRs) can display differential antimicrobial, antiviral and antitumor activities. Plos ONE. 11.06.2008, Vol. 3, Nº 6, e2371, todo el documento.	1-22

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
29.12.2011

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/40 (2006.01)

A61K36/064 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/04 (2006.01)

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

C07K, A61K, A61P

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, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.12.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 8-10, 15-17, 22	SI
	Reivindicaciones 1-7, 11-14, 18-21	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 8-10, 15-17, 22	SI
	Reivindicaciones 1-7, 11-14, 18-21	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 se publica.

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	Base de datos EBI [en línea] [recuperado el 13.05.2010] Recuperado de: http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[uniprot-id:Q5ANN9_CANAL][uniprot-acc:Q5ANN9_CANAL]	26.04.2005
D02	US 7241613 B1	10.07.2007
D03	LUSSIER M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 95, páginas 9825-9830	08.1998
D04	WO 9931269 A2 (MCGILL UNIVERSITY)	24.06.1999
D05	WO 02053728 A2 (ELITRA PHARMACEUTICALS INC)	11.07.2002
D06	OROZCO A. S. et al. Infection and Immunity. Vol. 68, Nº 3, páginas 1134-1141, ISSN 0019-9567/00	03.2000
D07	POLONELLI L. et al. Plos ONE. Vol. 3, Nº 6, e2371	11.06.2008

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 invención tiene por objeto una proteína, no glicosilada, que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma con capacidad para aumentar la adhesión de células tumorales al endotelio, donde dicha proteína es la proteína Kre9 de *Candida* spp (reivindicaciones 1 y 2), un organismo procariota que comprende un polinucleótido que codifica para dicha proteína (reivindicaciones de la 3 a la 6) y el procedimiento de obtención de la proteína utilizando tal organismo procariota (reivindicación 7). También tiene por objeto un método *in vitro* para identificar un compuesto potencialmente útil para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada que comprende poner en contacto una célula que expresa un receptor de IL-1 β , al que se une una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1, con dicha proteína y con el compuesto candidato e identificar los compuestos que inhiben la unión de la proteína con el receptor (reivindicaciones 8 y 15). Así mismo, tiene por objeto una composición que contiene la proteína de secuencia SEQ ID NO: 1 o bien el anticuerpo que la inhibe (reivindicaciones 11 a 14 y 18 a 21) y el uso de dicho anticuerpo en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de la metástasis (reivindicaciones 9, 10, 16, 17 y 22).

D01 divulga la secuencia de la proteína Kre9 de *Candida albicans*.

D02 anticipa polipéptidos de *Candida albicans*, entre ellos la proteína CaKre9 (SEQ ID NO 363), los genes que los codifican (SEQ ID NO 153), así como su uso para preparar anticuerpos, vacunas y composiciones terapéuticas y diagnósticas. En particular, divulga el uso de los mencionados péptidos o de anticuerpos monoclonales específicos frente a los mismos en la prevención y tratamiento de candidiasis y también un método de ensayo de compuestos que inhiban la actividad biológica de los polipéptidos que consiste en poner en contacto una célula que tenga aumentada o disminuida la expresión del polipéptido a estudiar con el compuesto candidato.

D03 describe el aislamiento del gen CaKRE9 de *Candida albicans* y establece que el producto de este gen, la proteína Kre9, la cual es necesaria en la síntesis de β -1,6-glucano, puede ser útil como diana de fármacos antifúngicos específicos. Además, divulga la secuencia de dicha proteína Kre9 de *Candida albicans*.

D04 anticipa una molécula de DNA aislada que codifica un gen esencial en la síntesis del glucano de la pared celular de *Candida albicans*, gen que se denomina CaKRE9 y, también, un método de ensayo de compuestos antifúngicos, *in vivo* e *in vitro*, que inhiban la síntesis, la unión y/o regulación del β -1,6-glucano y, específicamente, de compuestos antifúngicos que tengan como diana la proteína CaKre9p. Además, divulga un método *in vitro* de diagnóstico de enfermedades causadas por este microorganismo en el que se puede utilizar un kit basado en anticuerpos dirigidos contra la proteína CaKre9p (SEQ ID NO 1, 2, Fig. 1).

D05 divulga genes de *Candida albicans*, entre ellos el gen CaKRE9, y las proteínas codificadas por ellos, que son esenciales y potenciales dianas para el ensayo de nuevos fármacos, un método para inducir una respuesta inmune en un animal que comprende introducir en éste una composición que contiene uno de dichos péptidos, un método para identificar agentes antifúngicos cultivando el hongo en presencia del compuesto que se quiere estudiar, un método para identificar compuestos que inhiban el crecimiento de *Candida albicans* poniendo en contacto una célula del microorganismo que presente disminuida la actividad de un gen con el compuesto a ensayar y un método para tratar una infección causada por *Candida albicans* administrando una composición farmacéutica que comprenda una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto, por ejemplo un anticuerpo, que reduzca la actividad o el nivel de uno de los péptidos mencionados.

D06 demuestra la respuesta proinflamatoria de las células endoteliales frente a *Candida albicans*, importante desde el punto de vista terapéutico, ya que tales células influyen significativamente en la respuesta inflamatoria del huésped frente a los microorganismos patógenos. En el caso de *Candida albicans*, secretan IL-8, ICAM-I y VCAM-I, la expresión de esta última mediada por TNF- α , IL-1 α e IL-1 β .

D07 expone que CDRs aislados, representados por pequeños péptidos, pueden ejercer actividades antimicrobianas, antivirales y antitumorales. En el caso del anticuerpo monoclonal C7 frente a una manoproteína de la pared celular de *Candida albicans*, se comprueba que ejerce actividad fungicida contra dicho microorganismo y actividad antitumoral en células de melanoma murinas y humanas y en células de leucemia HL-60.

REIVINDICACIONES 1-7, 11-14 Y 18-21

Los documentos D01, D02, D03, D04 y D05 anticipan una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, por lo que esa proteína no es nueva ni tampoco el procedimiento de obtención de la misma, perfectamente conocido en el estado de la técnica. Tampoco es nuevo un anticuerpo que pueda reconocer e inhibir la actividad de dicha proteína de secuencia ya conocida ya que, además, en los documentos mencionados se expone el uso de la proteína para preparar anticuerpos e incluso el uso de los mismos como antifúngicos o con fines diagnósticos.

En consecuencia, las características de las reivindicaciones 1-7, 11-14 y 18-21 ya son conocidas, por lo que esas reivindicaciones no se pueden considerar nuevas a la vista del estado de la técnica y, por lo tanto, tampoco presentan actividad inventiva.

REIVINDICACIONES 8 Y 15

D02 anticipa un método de ensayo de compuestos que inhiban la actividad biológica de polipéptidos, como la proteína CaKre9 de *Candida albicans*, que consiste en poner en contacto una célula que tenga aumentada o disminuida la expresión del polipéptido a estudiar con el compuesto candidato pero a diferencia de la presente invención, la célula sobreexpresa o infraexpresa la proteína en cuestión, no se pone en contacto con ella o se hace un screening de compuestos que se unan a la proteína.

D04 divulga un método de ensayo de compuestos antifúngicos, *in vivo* e *in vitro*, que inhiban la síntesis, la unión y/o regulación del β -1,6-glucano y, específicamente, de compuestos antifúngicos que tengan como diana la proteína CaKre9p.

D05 divulga un método para identificar agentes antifúngicos cultivando el hongo en presencia del compuesto que se quiere estudiar y un método para identificar compuestos que inhiban el crecimiento de *Candida albicans* poniendo en contacto una célula del microorganismo que presente disminuida la actividad de un gen con el compuesto a ensayar.

Tales métodos son diferentes del que es objeto de la presente invención que comprende poner en contacto una célula que expresa un receptor de IL-1 β al que se une una proteína que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1, o una variante o fragmento funcionalmente equivalente de la misma, con dicha proteína y con el compuesto candidato e identificar los compuestos que inhiben la unión de la proteína con el receptor de IL-1 β .

Por tanto, las reivindicaciones 8 y 15 se pueden considerar nuevas a la vista del estado de la técnica y presentan actividad inventiva.

REIVINDICACIONES 9, 10, 16, 17 Y 22

D05 expone el uso de inhibidores de los péptidos objeto de la invención como anticancerígenos por su homología con el gen del hongo. D07 demuestra que el anticuerpo monoclonal C7 frente a una manoproteína de la pared celular de *Candida albicans*, ejerce actividad fungicida contra dicho microorganismo y actividad antitumoral en células de melanoma murinas y humanas y en células de leucemia HL-60.

Sin embargo, aunque si se ha comprobado el efecto antitumoral de anticuerpos dirigidos contra otras manoproteínas de la pared celular de *Candida albicans*, en la documentación consultada no se ha encontrado el uso de anticuerpos frente a la proteína CaKre9 de *Candida albicans* en el tratamiento de la metástasis y, por tanto, las reivindicaciones 9, 10, 16, 17 y 22 se pueden considerar nuevas a la vista del estado de la técnica y presentan actividad inventiva.