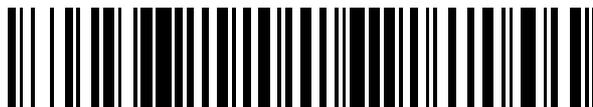


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 298**

21 Número de solicitud: 201230195

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

02.04.2009

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.10.2013

62 Número y fecha presentación solicitud principal:

P 200900907 02.04.2009

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO (100.0%)
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa (Bizkaia) ES**

72 Inventor/es:

**HERNANDO ECHEVARRÍA, Fernando;
RAMÍREZ GARCÍA, Andoni;
VIDAL-VANACLOCHA, Fernando;
MENDOZA ARTECHE, Lorea y
GALLOT ESCOBAL, Natalia**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA METÁSTASIS**

57 Resumen:

Composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la metástasis.

La presente invención se relaciona con el empleo de un compuesto con capacidad de unión a una manoproteína y bloquear la unión de dicha manoproteína a un receptor de las células endoteliales, en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada. Asimismo, la presente invención también contempla métodos dirigidos a identificar un compuesto potencialmente útil para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada, a pronosticar la probabilidad de un paciente que padece cáncer a sufrir metástasis y a diseñar una terapia personalizada a un paciente que padece cáncer.

ES 2 425 298 A2

DESCRIPCIÓN

COMPOSICIONES FARMACEÚTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA METÁSTASIS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se relaciona con el empleo de un agente antifúngico o de un compuesto con capacidad de unión a una manoproteína y bloquear la unión de dicha manoproteína a un receptor de las células endoteliales, en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada. Asimismo, la presente invención también contempla
10 métodos dirigidos a identificar un compuesto potencialmente útil para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada, a pronosticar la probabilidad de un paciente que padece cáncer a sufrir metástasis y a diseñar una terapia personalizada a un paciente que padece cáncer.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

En los hongos, las glicoproteínas son denominadas generalmente manoproteínas porque el principal carbohidrato existente en ellas es la manosa, aunque también se pueden encontrar otros azúcares y fósforo formando enlaces fosfodiéster. Atendiendo a las diferencias en la estructura de las manoproteínas se pueden distinguir dos serotipos
20 diferentes: A y B. Las manoproteínas se encuentran distribuidas por toda la pared, acumulándose particularmente en la superficie de la misma y en las proximidades de la membrana plasmática. Las manoproteínas juegan un importante papel en la adhesión de las levaduras a las células endoteliales (Orozco *et al.*, 2000; Infect Immun. 68: 1134-1141).

25

Algunas manoproteínas, localizadas en la pared de los tubos germinales y levaduras, son secretadas al medio. La presencia de manosas en el torrente sanguíneo del hospedador es rápidamente eliminada debido a la presencia de receptores de manosa en varios tipos celulares (Bijsterbosch *et al.*, 1996; Eur J Biochem, 237: 344-349; Stahl
30 & Ezekowitz, 1998; Current Opin Immunol. 10: 50-55; Apostolopoulos & McKenzie, 2001; Curr Mol Med, 1: 469-474). Además de tener funciones antigénicas, localizadas en los restos azúcares del epitopo reconocido por los anticuerpos, algunas han demostrado tener efectos inmunosupresivos (Nelson *et al.*, 1991; Clin Microbiol Rev, 4:

1-19) y linfoproliferativos (Podzorski *et al.*, 1990; J Immunol., 144: 707-716). Mediante el uso de inhibidores específicos de la N-glicosilación como la tunicamicina, se ha visto no solamente la falta de reconocimiento de estas manoproteínas antigénicas por parte de los anticuerpos, sino también la inhibición de la formación de nuevas yemas, 5 deteniéndose la división celular.

El manano representa el 15-23% del peso seco de la pared y el 40% de los polisacáridos de la misma. Se encuentra asociado covalentemente a las proteínas mediante enlaces N-glicosídicos y O-glicosídicos. Esta fracción manoproteica es el 10 principal componente de la matriz de la pared celular en la que se encuentra embebido el esqueleto microfibrilar de β -glucanos y quitina.

El término manano también ha sido utilizado para referirse al principal componente soluble inmunodominante presente en el exterior de la pared celular 15 denominado complejo fosfomanoproteico o fosfopeptidomanano. Esta fracción de la pared celular contiene homopolímeros de D-manosa (como principal componente), un 3-5% de proteína y un 1-2% de fosfato. Atendiendo al tipo de unión entre el azúcar y la proteína se pueden distinguir:

- 20 • Polímeros de manosa altamente ramificados y de alto peso molecular, unidos al aminoácido asparragina del péptido mediante un enlace N-glicosídico a través de dos N-acetilglucosaminas con un núcleo altamente conservado tanto en hongos como en células animales, y
- Oligosacáridos de manosa cortos y sin ramificar unidos a los grupos hidroxilo de 25 los aminoácidos serina o treonina del péptido mediante un enlace O-glicosídico.

La metástasis (de griego: *meta*, mas allá; y *stasis*, detención) 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 30 reimplantan. Su producción implica un complejo proceso integrado por una sucesión de etapas interdependientes (Weiss, L. 1985. Principles of metastasis. New York, N.Y.), 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:

5 (i)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.

10 (ii)Diseminación de las células tumorales; Las células que acceden al torrente circulatorio, además de tener que adaptarse a las diferentes condiciones mediambientales de la sangre y a los efectos mecánicos causados por la hemodinámica circulatoria, tienen que escapar del efecto tumoricida del sistema inmune.

15 (iii)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.

20 (iv)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.

25 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 célula tumoral y el endotelio vascular intervienen moléculas de adhesión que son expresadas, tanto por la célula tumoral como por la célula endotelial. Este hecho sugiere que el potencial metastático
30 de cada célula tumoral pueda estar influenciado por el tipo de moléculas de adhesión que son expresadas durante la interacción entre la célula tumoral 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, se ha demostrado 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 identificar los mecanismos de acción y las moléculas implicadas en el proceso metastásico de las células tumorales que faciliten el pronóstico de la misma, así como dianas terapéuticas que faciliten su tratamiento y prevención.

5

COMPENDIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un agente antifúngico en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada.

10

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un compuesto con capacidad de unión a una manoproteína, o a una variante funcionalmente equivalente de la misma, y bloquear la unión de dicha manoproteína, o variante funcionalmente equivalente de la misma, a un receptor de las células endoteliales, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada.

15

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un método para identificar un compuesto potencialmente útil para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada, que comprende poner en contacto un receptor de las células endoteliales y una manoproteína, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, y seleccionar un compuesto que bloquea la unión de dicha manoproteína, o variante funcionalmente equivalente de la misma, a dicho receptor de las células endoteliales.

20

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit que comprende un compuesto con capacidad de unión a una manoproteína, o a una variante funcionalmente equivalente de la misma, y bloquear la unión de dicha manoproteína, o variante funcionalmente equivalente de la misma, a un receptor de las células endoteliales, para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada.

25

30

En un quinto aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para pronosticar la probabilidad de un paciente que padece cáncer a sufrir metástasis, que comprende la detección en una muestra de dicho paciente de una levadura o de una manoproteína, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, en donde si dicha levadura o manoproteína, o variante funcionalmente equivalente de la misma, es detectada, entonces dicho paciente tiene una alta probabilidad de sufrir metástasis.

En un sexto aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada a un paciente que padece cáncer que comprende la detección en una muestra de dicho paciente de una levadura o de una manoproteína, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, en donde si dicha levadura o manoproteína, o variante funcionalmente de la misma, es detectada, entonces el paciente es candidato a recibir un tratamiento basado en un agente antifúngico o en un compuesto con capacidad de unión a una manoproteína, o a una variante funcionalmente equivalente de la misma, y bloquear la unión de dicha manoproteína, o variante funcionalmente equivalente de la misma, a un receptor de las células endoteliales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 describe el efecto del estado morfológico de diferentes cepas de *C. albicans* en la adhesión relativa de células del MB16 al ESH (endotelio sinusoidal hepático): Blastoconidios (□) y tubo germinal (■). (*) Diferencias estadísticamente significativas con relación al control.

La Figura 2 describe el efecto de la viabilidad de los blastoconidios de *C. albicans* en la adhesión relativa de células del MB16 al ESH. (A) Blastoconidios vivos, (B) blastoconidios muertos por tratamiento con calor, (C) blastoconidios muertos por tratamiento con metaperiodato 20 mM y (D) blastoconidios muertos por tratamiento con metaperiodato 50 mM. (*) Diferencias estadísticamente significativas con relación al control.

La Figura 3 describe los resultados de la citometría de flujo donde se enfrentan la complejidad celular (SSC) con el tamaño (FSC), y la fluorescencia (FL1) con el tamaño

celular (FSC). R1: población viva. R2: muertas con metaperiodato a 20 mM. R3: muertas con metaperiodato a 50 mM.

La Figura 4 muestra el cociente carbohidrato/proteína en blastoconidios y tubos
 5 germinales de diferentes cepas de *C. albicans*. Blastoconidios (□) y tubo germinal (■).
 (*) Diferencias estadísticamente significativas.

La Figura 5 describe el efecto de diferentes concentraciones de levaduras de *C.
 albicans* vivas y muertas mediante oxidación con metaperiodato a 20 y 50 mM en la
 10 producción de IL-18 por el ESH. (*) Diferencias significativas con respecto al control.

La Figura 6 muestra las fotografías de las células del ESH tras ser incubadas con
 manano comercial (A), extracto crudo (B), fracción proteica (C) y fracción
 manoproteica (D).
 15

La Figura 7 describe la adhesión relativa de células del MB16 al ESH incubado
 con manano comercial y la fracción manoproteica de *C. albicans* purificada (FMN). (*)
 Diferencias significativas con respecto al control.

La Figura 8 describe la adhesión relativa de células del MB16 al ESH incubado
 con la fracción proteica, el extracto crudo y la fracción manoproteica (□). Liberación de
 TNF- α incubado con la fracción proteica, el extracto crudo y la fracción manoproteica
 (■). (*) Diferencias significativas con respecto al control.
 20

La Figura 9 muestra el aumento de la adhesión tumoral inducida por la incubación
 del ESH de ratón con *C. albicans* o sus manoproteínas en medio basal y utilizando un
 anticuerpo que bloquea el receptor de manosa a dos concentraciones distintas. La
 adhesión se expresa en unidades relativas. (*) Diferencias significativas con respecto al
 control.
 25

La Figura 10 muestra el aumento de la producción de IL-18 inducida por la
 incubación del ESH con *C. albicans* o sus manoproteínas en medio basal y utilizando un
 anticuerpo que bloquea el receptor de manosa. (*) Diferencias significativas con
 30

respecto al control. (**) Reducción significativa con respecto a la situación sin bloqueante.

La Figura 11 muestra una electroforesis bidimensional del extracto crudo de *C. albicans* visualizada mediante tinción de plata.

La Figura 12 muestra una electroforesis bidimensional de la fracción proteica de *C. albicans* visualizada mediante tinción de plata.

La Figura 13 muestra una electroforesis bidimensional de la fracción manoproteica de *C. albicans* visualizada mediante tinción de plata.

La Figura 14 describe un Western blot bidimensional del extracto crudo de *C. albicans* revelada mediante quimioluminiscencia utilizando Con A-HRP.

La Figura 15 muestra una electroforesis 1D de las 5 subfracciones manoproteicas obtenidas mediante electroforesis preparativa a partir del extracto crudo teñidas con plata (A). Detección con Con A-HRP y revelado con quimioluminiscencia de las 5 subfracciones tras realizar la cromatografía de afinidad a partir de las obtenidas mediante electroforesis preparativa (B). F1: 0 - 30 kDa, F2: 30 - 45 kDa, F3: 45 - 66 kDa, F4: 66 - 115 kDa, F5: >115 kDa.

La Figura 16 describe a la proporción Carbohidrato/Proteína de cada una de las subfracciones manoproteicas obtenidas. FMN1: 0 - 30 kDa, FMN2: 30 - 45 kDa, FMN3: 45 - 66 kDa, FMN4: 66 - 115 kDa, FMN5: >115 kDa.

La Figura 17 muestra la adhesión relativa de células del melanoma B16 al ESH incubado con las subfracciones separadas según su peso molecular. FMN1: 0 - 30 kDa, FMN2: 30 - 45 kDa, FMN3: 45 - 66 kDa, FMN4: 66 - 115 kDa, FMN5: >115 kDa. (*) Diferencias significativas con respecto al aumento inducido por el manano comercial.

La Figura 18 muestra una electroforesis 2D de la FMN teñido con Azul de Coomassie con los puntos secuenciados numerados.

La Figura 19 muestra una electroforesis 1D de las subfracciones obtenidas mediante isoelectroenfoque preparativo a partir del extracto crudo teñidas con plata (A). Detección con Con A-HRP y revelado con quimioluminiscencia de las subfracciones
 5 tras realizar la cromatografía de afinidad (B). F1: <4,25, F2: 4,25 – 5, F3: 5 – 5,6, F4: >5,6.

La Figura 20 muestra la adhesión relativa de células del melanoma B16 al ESH incubado con las subfracciones manoproteicas separadas según su punto isoeléctrico.
 10 FMN1: <4,25, FMN2: 4,25 – 5, FMN3: 5 – 5,6, FMN4: >5,6. (*) Diferencias significativas respecto al manano comercial.

La Figura 21 muestra una reproducción visual del fraccionamiento de las manoproteínas de *C. albicans* realizado según el peso molecular y el punto isoeléctrico.
 15

La Figura 22 muestra una electroforesis bidimensional de las manoproteínas de las cepas de *C. albicans* UPV1413 (superior), NCPF3153 (central) y UPV1360 (inferior) teñidas mediante azul de Coomassie. Aparecen marcadas la proteína disulfuro isomerasa (A), la subunidad básica de la enolasa (B) y la aminopeptidasa (C).
 20

La Figura 23 muestra la proliferación de células tumorales en medio control, suplementado con suero bovino fetal (SBF) y con la fracción manoproteica (FMN).

La Figura 24 muestra la proliferación de células tumorales tras 48 h de incubación
 25 en medio control, suplementado con suero bovino fetal (SBF) y con la fracción manoproteica FMN3 (45-66 kDa).

La Figura 25 muestra la adhesión relativa de células del melanoma B16 al ESH tratado con la FMN bloqueando y sin bloquear el receptor de la IL-1 β del ESH con IL-Ra (\square). Liberación de TNF- α por el ESH tratado con la FMN bloqueando y sin bloquear
 30 el receptor de la IL-1 β del ESH con IL-Ra (\blacksquare).

La Figura 26 muestra un Western blot bidimensional de las manoproteínas de *C. albicans* UPV1413 (A) evaluadas frente al anticuerpo neutralizante anti-mouse IL-1 β revelado mediante quimioluminiscencia.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los inventores de la presente invención han descubierto que la inflamación originada en respuesta a la unión de *Cándida albicans* a los receptores de endoteliales, no sólo tiene el efecto de atraer fagocitos a la zona infectada para eliminar el invasor, sino que en pacientes con cáncer, sorprendentemente, incrementa directamente el riesgo de adhesión de las células tumorales a esa misma zona, lo que supone el inicio de un proceso metastásico. Asimismo, los inventores han descubierto que dicha capacidad de *C. albicans* de incrementar directamente el riesgo sufrir metástasis es debido a las manoproteínas presentes en la fracción manoproteica de la levadura, las cuales interaccionan con los receptores de las células endoteliales, tales como los receptores de citoquinas proinflamatorias, como por ejemplo, el receptor de IL-1 β , provocando no sólo la respuesta inflamatoria a la infección, sino también la adhesión de las células tumorales al endotelio originando el proceso metastásico del tumor.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se relaciona con el empleo de un agente antifúngico en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada.

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.

Por tanto, en una realización particular, la enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada es un proceso tumoral, un proceso metastásico, un proceso inflamatorio, restenosis o una enfermedad que provoque una respuesta inmune celular.

En el contesto de la presente invención, se entiende por “proceso tumoral” aquellas enfermedades caracterizadas por el desarrollo de un tumor, como es el caso del cáncer. Ejemplos de tumores que pueden ser tratados con la composición farmacéutica descrita en la presente invención incluyen, sin ser limitante, tumores de pulmón, de 5 próstata, de cabeza y cuello, de testículo, de cerebro, de piel, de colon, de recto, de esófago, de traquea, de páncreas, de hígado, de mama, de ovario, de sistema linfático, leucemia, cervical, melanoma, de riñón, de vejiga, de tiroides, de hueso y de estómago.

En el contexto de la presente invención, el término “proceso metastásico” y 10 “metástasis” se consideran análogos y son empleados indistintamente. Por metástasis se entiende el proceso por el cual células cancerosas se propagan a otros órganos distintos a donde se originó el tumor primario por medio de canales linfáticos y vasos sanguíneos. El experto en la materia advertirá que la composición farmacéutica de la invención puede emplearse en la inhibición de cualquier tipo de metástasis formada a 15 partir de prácticamente cualquier tipo de tumor.

La invención contempla el empleo de agente antifúngicos en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de las metástasis en cualquier órgano del cuerpo, tales como cabeza y cuello (cara, ojo, boca, lengua, 20 dientes, nariz, orejas, cuero cabelludo, laringe, faringe, glándulas salivares, meninges, cerebro, glándula tiroidea y paratiroidea), espalda y columna vertebral (vértebras y médula espinal), tórax (glándulas mamarias, costillas, pulmones, corazón, mediastino, esófago y diafragma), abdomen (peritoneo, estómago, duodeno, intestino, colon, hígado, riñón, glándula suprarrenal, apéndice y páncreas), pelvis (sacro, cóccix, ovarios, 25 trompa de Falopio, útero, vagina, vulva, clítoris, perineo, vejiga urinaria, testículos, recto y pene) y extremidades (músculo, hueso, nervios, mano, muñeca, codo, hombro, cadera, rodilla o tobillo).

Por otro lado, los tumores a partir de los que se origina la metástasis incluyen, sin 30 ser limitante, tumores de pulmón, de próstata, de cabeza y cuello, de testículo, de cerebro, de piel, de colon, de recto, de esófago, de traquea, de páncreas, de hígado, de mama, de ovario, de sistema linfático, leucemia, cervical, melanoma, de riñón, de

vejiga, de tiroides, de hueso y de estómago. En una forma de realización preferida, el proceso metastásico se origina a partir de un tumor de hígado.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “un proceso inflamatorio” o “enfermedad inflamatoria” a aquella 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. En una realización particular, la enfermedad inflamatoria o proceso inflamatorio es un proceso inflamatorio mediado por citocinas.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “restenosis” a aquella enfermedad que cursa con una proliferación y 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.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “una enfermedad que provoca una respuesta inmune celular” a aquella enfermedad que provoca una 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.

25

El agente antifúngico o antimicótico empleado en la elaboración de la composición farmacéutica de la presente invención engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente.

30

Los agentes antifúngicos o antimicóticos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura, a su origen (si son producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química), a su espectro de acción (amplio o restringido) o a su sitio de acción.

Ejemplos de antifúngicos incluyen, sin limitar a, (i) polienos, tales como nistatina, natamicina y anfotericina B, (ii) azoles, tales como imidazoles (miconazol, clotrimazol), triazoles (fluconazol, itraconazol, ketoconazol) y triazoles de segunda generación (voriconazol, ravuconazol, posaconazol), (iii) alilaminas, tales como Terbinafina y naftifina, (iv) lipopéptidos, tales como papulacandinas, triterpenos glicosilados y equinocandinas (caspofungina, anidulofungina, micafungina) y (v) pirimidinas fluoradas, como la flucitosina. Otros antifúngicos incluyen, por ejemplo, yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato y griseofulvin. En una realización particular, el agente antifúngico se selecciona entre un polieno, un azol, una alilamina, un lipopopéptido y una pirimidina fluorada.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un compuesto con capacidad de unión a una manoproteína, o a una variante funcionalmente equivalente de la misma, y bloquear la unión de dicha manoproteína, o variante funcionalmente equivalente de la misma, a un receptor de las células endoteliales, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular.

En la presente invención se entiende por “manoproteína” a una glicoproteína en donde el principal carbohidrato existente en ellas es la manosa. Las manoproteínas se encuentran principalmente formando parte de la pared celular de los hongos y levaduras, donde juegan un importante papel en la adhesión de las levaduras a las células endoteliales y endoteliales. Así, si se realiza la separación de un extracto crudo de una levadura, tal como *C. albicans*, mediante, por ejemplo, una cromatografía de afinidad pueden obtenerse dos fracciones: una fracción manoproteica (FMN) y una fracción proteica (FP). Como entiende el experto en la materia, la FP es aquella que no contiene o contiene poca cantidad de manoproteínas.

Así, en una realización particular, la manoproteína procede de la fracción manoproteica de una levadura.

5 La mayoría de las levaduras son patógenos oportunistas que pueden causar infecciones comprometiendo el sistema inmune de las personas afectadas. Ejemplos de levaduras incluyen, sin limitar a, levaduras del género *Cryptococcus*, tal como *C. neoformans*, o levaduras del género *Cándida*, tales como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. viswanathii*,
 10 *C. lusitaniae*, *Candida famata*, *C. holmii*, *C. kefir*, *C. pelliculosa*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C. zeylanoides*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. minuta*, *R. glutinis*, *R. mucilaginosa* y *Trichosporon cutaneum*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, etc.

En otra realización particular, la manoproteína procede de la fracción
 15 manoproteica de una levadura, preferentemente de una levadura del género *Cándida*, más preferentemente, *C. albicans*.

Como es sabido por el experto en la materia, la FMN de una levadura (u otro organismo) puede obtenerse por cualquiera los métodos descritos en el estado de la
 20 técnica para la separación de proteínas tales como, sin limitar a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad (en columna de Con-A Sepharosa activada con Bromuro de cianógeno), de interacción hidrofóbica, de filtración en gel, HPLC), métodos electroforéticos (isoelectroenfoque preparativo, electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida-SDS (mono y bidimensionales), isoelectroenfoque preparativo en
 25 el Rotofor), solubilidad diferencial (precipitación con sulfato amónico), ultracentrifugación preparativa en gradiente de sacarosa. En caso de que sea necesario concentrar la proteína o eliminar sales e iones que puedan ser perjudiciales, se recurre a técnicas conocidas, tales como liofilización o ultrafiltración.

30 En la presente invención, las manoproteínas son separadas por electroforesis monodimensional, que permite separarlas en función de su peso molecular (Mw), Así, empleando las técnicas aquí mencionadas, el análisis de la composición de la FMN de *C. albicans* ha dado lugar a 5 subfracciones de distinto peso molecular, FMN1 (0 – 30

kDa), FMN2 (30-45 kDa), FMN3 (45-66 kDa), FMN4 (66-115 kDa) y FMN5 (>115 kDa). En una realización particular, la fracción manoproteica comprende, al menos, una manoproteína que presenta un peso molecular de entre 30 y 45 kDa o de entre 45 y 66 kDa.

5 Así, en una realización particular, la manoproteína que presenta un peso molecular de entre 45 y 66 kDa es una manoproteína seleccionada de entre disulfuro isomerasa, proteína de Zinc, aminopeptidasa Y, cetoácido-reductoisomerasa mitocondrial, factor de elongación Tu, factor de elongación de la traducción Tu, actina, enolasa, alcohol deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, fructosa bifosfato
10 aldolasa, 3-fosfoglicerato quinasa, isocitrato deshidrogenasa, GDP-manosa pirofosforilasa, formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión y ubiquinol cit-c reductasa.

Una vez separadas la FMN en las correspondientes subfracciones, la
15 identificación de las manoproteínas que comprenden una subfracción puede realizarse, por ejemplo, mediante una electroforesis bidimensional que permite separar las proteínas no sólo en base a su peso molecular si no también en función de su punto isoelectrico (pI), para obtener una huella peptídica.

20 Por tanto, en una realización particular, la fracción manoproteica comprende, al menos, una manoproteína que presenta un peso molecular de entre 45 y 66 kDa, y un punto isoelectrico de entre 5 y 5,6.

En otra realización todavía más particular, la manoproteína que presenta un peso
25 molecular de entre 45 y 66 kDa, y un punto isoelectrico de entre 5 y 5,6 comprende, al menos, una manoproteína seleccionada de entre aminopeptidasa Y, cetoácido-reductoisomerasa mitocondrial, factor de elongación Tu, factor de elongación de la traducción Tu, actina, enolasa, ubiquinol cit-c reductasa y alcohol deshidrogenasa.

30 La presente invención se basa en el descubrimiento de la capacidad de *C. albicans* o de sus manoproteínas de inducir la adhesión de células tumorales a células endoteliales, promoviendo con ello la metástasis del tumor. Por tanto, la presente invención se relaciona con el empleo de un compuesto con capacidad de unión a una

manoproteína y de bloquear la unión de dicha manoproteína a un receptor de las células endoteliales en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada.

5 En el contexto de la presente invención, se entiende por “un compuesto con capacidad de unión a una manoproteína y de bloquear la unión de dicha manoproteína a un receptor de las células endoteliales” a aquel compuesto que reconoce de forma específica una manoproteína, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, y se une a ella covalentemente bloqueando así la unión de dicha manoproteína, o variante
10 funcionalmente equivalente de la misma, a un receptor de las células endoteliales, consiguiendo con ello inhibir la adhesión celular de las células tumorales a las células endoteliales.

Ejemplos de compuestos capaces de reconocer de forma específica una
15 manoproteína y unirse covalentemente a ella son, por ejemplo, los anticuerpos, tales como los descritos en la solicitud de patente WO03/089607. Por tanto, en una realización particular, el compuesto con capacidad de unión a una manoproteína, o a una variante funcionalmente equivalente de la misma, y bloquear su unión a un receptor de las endoteliales es un anticuerpo.

20 El término “anticuerpo” se debe interpretar en un sentido amplio e incluye anticuerpos multiespecíficos, policlonales, monoclonales y fragmentos Fab de los mismos, $F(ab')_2$, siempre que se puedan unir específicamente a una manoproteína, o a una variante funcionalmente equivalente de la misma, y bloquear la unión de dicha
25 manoproteína, o variante funcionalmente equivalente de la misma, a un receptor de las células endoteliales, consiguiendo con ello la inhibición de la adhesión celular de las células tumorales a las células endoteliales. Ejemplos de anticuerpos que se pueden utilizar en el contexto de la presente son, por ejemplo y no están limitados a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes,
30 anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos completamente humanos, etc.

Los anticuerpos policlonales son originalmente mezclas heterogéneas de moléculas de anticuerpo producidas en el suero de animales que se han inmunizado con un antígeno. También incluyen anticuerpos policlonales monoespecíficos obtenidos a partir de mezclas heterogéneas, por ejemplo, por medio de cromatografía en columna
5 con péptidos de un epítipo individual del antígeno de interés.

Un anticuerpo monoclonal es una población homogénea de anticuerpos específicos para un epítipo individual del antígeno. Estos anticuerpos monoclonales se pueden preparar por medio de técnicas convencionales que ya se han descrito, por
10 ejemplo, en Köhler y Milstein [Nature, 1975; 256: 495-497] ó Harlow y Lane [“Using Antibodies. A Laboratory Manual” por E. Harlow y D. Lane, Editor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; 1998 (ISBN 978-0879695439)].

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

Un anticuerpo completamente humano es un anticuerpo o anticuerpos que se han producido en animales transgénicos con un sistema inmune humano o mediante
25 inmunización *in vitro* de células inmunes humanas (incluyendo tanto inmunización genética como tradicional con o sin adyuvantes y antígeno puro o impuro; o por medio de cualquier método para exponer el antígeno al sistema inmune) o por medio de librerías nativas/sintéticas producidas a partir de células inmunes humanas. Estos anticuerpos se pueden obtener y cribar de animales transgénicos (ratones, por ejemplo)
30 en los que se han clonado genes de las inmunoglobulinas humanas y que se inmunizan con el antígeno diana (la manoproteína o una variante funcionalmente equivalente de la misma). Estos anticuerpos se pueden obtener mediante cribado de regiones variables de cadena sencilla (scFv) o regiones de unión al antígeno (Fab) humanas presentadas en

fagos y posteriormente, clonación e injerto en un anticuerpo humano o por medio de cualquier otro método, conocido por el experto en la materia, para producir y presentar las librerías generadas mediante clonación de las regiones variables de ambas cadenas y posteriormente clonación/mutación de las mismas para generar librerías de anticuerpos.

5

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo monoclonal construido por medio de 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.

10

El anticuerpo con capacidad de unirse de manera específica a una manoproteína se puede obtener mediante técnicas convencionales de recombinación o ingeniería genética, técnicas convencionales para la producción de anticuerpos, extracción y purificación de fluidos biológicos o tejidos, o cualquier otra técnica convencional para obtener proteínas y anticuerpos, que son ampliamente conocidas por los expertos en la materia. Entre dichas técnicas se pueden encontrar, sin que esto sea ninguna limitación: técnicas de inmunización en animales, incluyendo animales transgénicos para los genes de las inmunoglobulinas humanas, producción de anticuerpos monoclonales por medio de hibridomas, producción por medio de librerías de anticuerpos, que pueden ser nativas, sintéticas, o derivadas de organismos inmunizados contra el antígeno de interés y que se podrían cribar por medio de métodos de presentación diferentes (presentación en fago, presentación en ribosoma, etc.) y posteriormente, por medio de técnicas de ingeniería genética, se podrían rediseñar y expresar en vectores diseñados para producir anticuerpos recombinantes con tañamos, composición y estructura diferentes. Se puede encontrar una revisión de los métodos principales para producir y purificar anticuerpos en, por ejemplo:

- “Handbook of Therapeutic Antibodies”, por S. Dübel. Editor: Wiley-VCH, 2007, Vol: I a III (ISBN 978-3527314539);
- “Antibodies: Volume 1: Production and Purification” por G. Subramanian Ed., Editor: Springer, 1ª Ed, 2004 (ISBN 978-0306482458);
- “Antibodies: Volume 2: Novel Technologies and Therapeutic Use” por G. Subramanian Ed., Editor: Springer, primera edición, 2004 (ISBN 978-0306483158);

· “Molecular Cloning: a Laboratory Manual”, de J. Sambrook y D.W. Russel Eds., Editor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, tercera edición, 2001 (ISBN 978-0879695774).

5 En la presente invención se entiende por “variante funcionalmente equivalente de una manoproteína”, una proteína cuya secuencia de aminoácidos (i) es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos de dicha manoproteína y (ii) realiza las mismas funciones que dicha manoproteína. La similitud funcional de una proteína con otra concreta puede determinarse mediante ensayos de interferencia con la expresión del
10 gen que codifica la proteína concreta que, al reducir la expresión, reducirían la actividad de esa proteína, y la posterior recuperación de la actividad mediante expresión de la secuencia de la otra proteína. Estos experimentos se realizan utilizando secuencias de ARNs de interferencia específicas y complementarias para la secuencia de la proteína concreta y vectores de expresión que incorporen la secuencia específica de la otra
15 proteína regulada por un promotor inducible o no.

Un ensayo para averiguar si una variante de una manoproteína tal como aquí se ha definido es funcionalmente equivalente a una manoproteína, y por lo tanto, desempeña la misma función (promover la adhesión celular de las células tumorales a las células
20 epiteliales), es un ensayo de adhesión tumoral, en este caso inducida por la variante de una manoproteína que va a ser ensayada para averiguar si es funcionalmente equivalente a la manoproteína de que la es variante, en donde la medida de la adhesión se lleva a cabo utilizando un método basado en la medida de la fluorescencia. Brevemente, dicho ensayo comprende marcar células tumorales, por ejemplo, células de melanoma MB16,
25 con un agente fluorescente (por ejemplo, BCECF-AM) y posteriormente, poner en contacto células endoteliales incubadas con la variante a ensayar con las células tumorales marcadas. Una vez transcurrido el tiempo de adhesión, los co-cultivos se excitan con luz apropiada al marcador empleado (en caso de utilizar BCECF-AM la longitud de onda a aplicar es de 488 nm) y se registra la fluorescencia emitida por el
30 marcador incorporado a las células tumorales (por ejemplo, mediante barrido de plata). Tras varios lavados para eliminar las células endoteliales no adheridas a las células endoteliales, se añade medio de adhesión y se procede de nuevo a la lectura de la fluorescencia emitida. De este modo se puede medir la adhesión tumoral relativa que,

comparada con el control, permite identificar una variante como funcionalmente equivalente si los datos relativos de fluorescencia son mayores que los datos obtenidos por el control. Más detalles sobre el ensayo se pueden encontrar en el apartado material y métodos de los Ejemplos que acompañan a la presente descripción.

5

Una secuencia de aminoácidos es sustancialmente homóloga a una secuencia de aminoácidos determinada cuando presenta un grado de identidad de, al menos, un 70%, ventajosamente de, al menos, un 75%, típicamente de, al menos, un 80%, preferentemente de, al menos, un 85%, más preferentemente de, al menos, un 90%, aún
10 más preferentemente de, al menos, un 95%, 97%, 98% ó 99%, respecto a dicha secuencia de aminoácidos determinada. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST [Altschul S.F. *et al.* Basic local alignment search tool.
15 J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10].

El experto en la materia entiende que, las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de una proteína que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína, son mutaciones
20 evolutivamente neutras que no afectan a su estructura global ni a su funcionalidad. Dichas variantes caen dentro del ámbito de la presente invención. Están incluidas también dentro del ámbito de la invención aquellas variantes que presenten inserciones, deleciones o modificaciones de uno o más aminoácidos respecto a una manoproteína, y conserven, además, las mismas funciones que dicha manoproteína.

25

Por tanto, tal como aquí se utiliza, el término “variante funcionalmente equivalente” también incluye cualquier fragmento de una manoproteína. El término “fragmento” se refiere a un péptido que comprende una porción de una proteína. En este caso, un fragmento funcionalmente equivalente de una manoproteína es un péptido o
30 proteína que comprende una porción de una manoproteína y las mismas funciones que dicha manoproteína. Un ensayo para averiguar si un fragmento de una manoproteína es funcionalmente equivalente a dicha manoproteína ha sido explicado anteriormente en la presente descripción.

Tal como se ha explicado previamente, la capacidad de *C. albicans* de incrementar directamente el riesgo de un paciente que padece cáncer a sufrir metástasis es debido a las manoproteínas presentes en la fracción manoproteica de la levadura, interaccionan con los receptores de las células endoteliales, provocando un incremento de la adhesión de las células tumorales a las células endoteliales.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “receptor de una célula endotelial” a aquellos receptores de moléculas que se encuentran en la superficie de las células endoteliales y que permiten la unión de ligandos a las células, desencadenado así cascadas de señales que activan o desactivan distintos procesos celulares como proliferación celular, apoptosis, agregación celular, respuesta proinflamatoria, etc....

En una realización particular, el receptor de las células endoteliales es un receptor de citoquinas proinflamatorias. Ejemplos de receptores de citoquinas proinflamatorias incluyen, sin limitar a, el receptor del TNF- α , el receptor de la IL-1, el receptor de la IL-1 β , el receptor de la IL-6, el receptor de la IL-8, etc. En una realización todavía más particular, el receptor de citoquina proinflamatoria es el receptor de la interleuquina 1-beta (IL1- β).

Como se ha indicado anteriormente, la invención se relaciona con el empleo de un compuesto con capacidad de unión a una manoproteína y bloquear la unión de dicha manoproteína a un receptor de las células endoteliales, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada o de una enfermedad causada por un agente infeccioso.

En una realización particular, la enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada es un proceso tumoral, un proceso metastásico, un proceso inflamatorio, preferentemente mediado por citocinas, restenosis o una enfermedad que provoque una respuesta inmune celular.

En otra realización particular, el proceso metastásico se origina a partir de tumor de hígado.

El significado de dichos términos, así como ejemplos de los mismos, han sido
5 citados previamente.

En una realización particular, la composición farmacéutica comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y, adicionalmente, en otra realización particular, puede comprender un compuesto antifúngico tal como los citados
10 previamente en la presente memoria.

Para su uso en medicina, la composición farmacéutica de la invención puede estar formulada en forma de prodroga, sal, solvato o clatrato, bien en forma aislada bien en combinación con principios activos adicionales. Los excipientes preferidos para su uso
15 en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas. La composición farmacéutica se puede formular en una forma de dosis farmacéutica sólida (por ejemplo, comprimidos, cápsulas, comprimidos recubiertos de azúcar, gránulos, supositorios, sólidos estériles amorfos o cristalinos que se pueden reconstruir para proporcionar formas líquidas, etc.), líquida (por ejemplo, soluciones, suspensiones,
20 emulsiones, elixires, lociones, ungüentos etc.) o semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). Los ejemplos de soportes farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tal como emulsiones de aceite en agua, diferentes tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos soportes se pueden formular
25 mediante procesos convencionales conocidos en el estado anterior de la técnica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de kit que comprende un compuesto con capacidad de unión a una manoproteína, o a una variante funcionalmente equivalente de la misma, y bloquear la unión de dicha manoproteína, o
30 variante funcionalmente equivalente de la misma, a un receptor de las células endoteliales, para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada.

En la presente invención, un “kit” se entiende como un producto que contiene los diferentes principios o compuestos activos de la invención (es decir, un compuesto con capacidad de unión a una manoproteína, o a una variante funcionalmente equivalente de la misma, y bloquear la unión de dicha manoproteína, o variante funcionalmente equivalente de la misma, a un receptor de las células endoteliales) 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 los principios activos de la invención 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.

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.

Todas las realizaciones particulares que definen este aspecto inventivo han sido citadas, descritas y explicadas en aspectos inventivos anteriores y, en consecuencia, no es necesario más comentarios a este respecto.

5 Por lo tanto, en una realización particular del kit de la invención, la manoproteína procede de la fracción manoproteica de una levadura, preferiblemente, de una levadura del género *Candida*, más preferidamente de *Candida albicans*.

10 En otra realización particular, la fracción manoproteica comprende, al menos, una manoproteína que presenta un peso molecular de entre 30 y 45 kDa o de entre 45 y 66 kDa.

15 En otra realización particular, la manoproteína que presenta un peso molecular de entre 45 y 66 kDa de peso molecular es una manoproteína seleccionada de entre disulfuro isomerasa, proteína de Zinc, aminopeptidasa Y, cetoácido-reductoisomerasa mitocondrial, factor de elongación Tu, factor de elongación de la traducción Tu, actina, enolasa, alcohol deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, fructosa bifosfato aldolasa, 3-fosfoglicerato quinasa, isocitrato deshidrogenasa, GDP-manosa pirofosforilasa, formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión y ubiquinol cit-c
20 reductasa.

25 En otra realización particular, la fracción manoproteica comprende, al menos, una manoproteína que presenta un peso molecular de entre 45 y 66 kDa, y un punto isoeléctrico de entre 5 y 5,6.

30 En otra realización particular, la manoproteína que presenta un peso molecular de entre 45 y 66 kDa, y un punto isoeléctrico de entre 5 y 5,6 comprende, al menos, una manoproteína seleccionada de entre aminopeptidasa Y, cetoácido-reductoisomerasa mitocondrial, factor de elongación Tu, factor de elongación de la traducción Tu, actina, enolasa, ubiquinol cit-c reductasa y alcohol deshidrogenasa.

En otra realización particular, el receptor de las células endoteliales es un receptor de citoquinas proinflamatorias, preferentemente, el receptor de la interleuquina 1-beta (IL1- β).

5 En otra realización particular, la enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada es un proceso tumoral, un proceso metastásico, un proceso inflamatorio, preferentemente mediado por citocinas, restenosis o una enfermedad que provoque una respuesta inmune celular.

10 En otra realización particular, el proceso metastásico se origina a partir de tumor de hígado.

En otra realización particular, el compuesto con capacidad de unión a una manoproteína, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, y bloquear su
15 unión a un receptor citoquinas proinflamatorias es un anticuerpo.

El descubrimiento realizado por los inventores de la presente invención, basado en la capacidad de *C. albicans* o de las manoproteínas obtenidas de dicha levadura de inducir la adhesión de células tumorales a las células endoteliales a través de la
20 interacción con los receptores de las células endoteliales, y promover así la metástasis, también puede emplearse para identificar un compuesto útil en la prevención y/o el tratamiento de enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada, pues cualquier compuesto que bloquee dicha interacción, impedirá la adhesión y con ello la metástasis.

25 Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para identificar un compuesto potencialmente útil para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada, que comprende poner en contacto un receptor de las células endoteliales y una manoproteína, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, y seleccionar un compuesto que bloquea la unión de dicha
30 manoproteína, o variante funcionalmente equivalente de la misma, a dicho receptor de las células endoteliales.

Tal como se ha expresado anteriormente, todas las realizaciones particulares que definen este aspecto inventivo han sido citadas, descritas y explicadas en aspectos inventivos anteriores y, en consecuencia, no es necesario más comentarios a este respecto.

5

Por lo tanto, en una realización particular, la manoproteína procede de la fracción manoproteica de una levadura, preferiblemente, de una levadura del género *Candida*, más preferidamente de *Candida albicans*.

10 En otra realización particular, la fracción manoproteica comprende, al menos, una manoproteína que presenta un peso molecular de entre 30 y 45 kDa o de entre 45 y 66 kDa.

15 En otra realización particular, la manoproteína que presenta un peso molecular de entre 45 y 66 kDa de peso molecular es una manoproteína seleccionada de entre disulfuro isomerasa, proteína de Zinc, aminopeptidasa Y, cetoácido-reductoisomerasa mitocondrial, factor de elongación Tu, factor de elongación de la traducción Tu, actina, enolasa, alcohol deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, fructosa bifosfato aldolasa, 3-fosfoglicerato quinasa, isocitrato deshidrogenasa, GDP-manosa
20 pirofosforilasa, formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión y ubiquinol cit-c reductasa.

25 En otra realización particular, la fracción manoproteica comprende, al menos, una manoproteína que presenta un peso molecular de entre 45 y 66 kDa, y un punto isoeléctrico de entre 5 y 5,6.

30 En otra realización particular, la manoproteína que presenta un peso molecular de entre 45 y 66 kDa, y un punto isoeléctrico de entre 5 y 5,6 comprende, al menos, una manoproteína seleccionada de entre aminopeptidasa Y, cetoácido-reductoisomerasa mitocondrial, factor de elongación Tu, factor de elongación de la traducción Tu, actina, enolasa, ubiquinol cit-c reductasa y alcohol deshidrogenasa.

En otra realización particular, el receptor de las células endoteliales es un receptor de citoquinas proinflamatorias, preferentemente, el receptor de la interleuquina 1-beta (IL1- β).

5 En otra realización particular, la enfermedad asociada a una adhesión celular indeseada es un proceso tumoral, un proceso metastásico, un proceso inflamatorio, preferentemente mediado por citocinas, restenosis o una enfermedad que provoque una respuesta inmune celular.

10 En otra realización particular, el proceso metastásico se origina a partir de tumor de hígado.

En otra realización particular, el compuesto con capacidad de unión a una manoproteína, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, y bloquear su
15 unión a un receptor citoquinas proinflamatorias es un anticuerpo.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para pronosticar la probabilidad de un paciente que padece cáncer a sufrir metástasis, que comprende la
20 detección en una muestra de dicho paciente de una levadura o de una manoproteína, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, en donde si dicha levadura o manoproteína, o variante funcionalmente equivalente de la misma, es detectada, entonces dicho paciente tiene una alta probabilidad de sufrir metástasis.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diseñar una
25 terapia personalizada a un paciente que padece cáncer que comprende la detección en una muestra de dicho paciente de una levadura o de una manoproteína, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, en donde si dicha levadura o manoproteína, o variante funcionalmente de la misma, es detectada, entonces el paciente es candidato a recibir un tratamiento basado en un agente antifúngico o en un compuesto con
30 capacidad de unión a una manoproteína, o a una variante funcionalmente equivalente de la misma, y bloquear la unión de dicha manoproteína, o variante funcionalmente equivalente de la misma, a un receptor de las células endoteliales.

Las realizaciones particulares de la invención que han sido citadas en la presente descripción, son aplicables a los aspectos inventivos dirigidos a un método *in vitro* para pronosticar la probabilidad de un paciente que padece cáncer a sufrir metástasis o un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada a un paciente que padece cáncer.

5

La invención se describe a continuación mediante los siguientes ejemplos que tienen un carácter ilustrativo y en ningún caso limitativo.

10

EJEMPLOS

En la realización de los Ejemplos 1 a 9 se utilizaron los Materiales y Métodos que se describen a continuación.

15

I. MATERIAL Y MÉTODOS

Procedencia, Mantenimiento y obtención de células de *C. albicans*

En la realización de esta invención se emplearon cuatro cepas:

20

–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 , mutante agerminativa gentilmente cedida por A Cassone (Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy); y

25

–la cepa de referencia NCPF3153 proveniente de la National Collection of Pathogenic Fungi.

30

En el mantenimiento de las levaduras se emplearon Caldo de Sabouraud (*SDB*) [*Glucosa 20 g/l, Peptona 10 g/l*], Agar Glucosa Sabouraud (*SDA*) [*Caldo Sabouraud II, Agar 15 g/l*] y Solución salina al 0,9%. Todos ellos fueron esterilizados en autoclave a 1,1 atm., 15 minutos.

Las cepas se mantuvieron a 4 °C en tubos inclinados de medio SDA después de una incubación previa de 24 horas a 24 °C y se realizaron resiembras mensuales en el

mismo medio de mantenimiento. Las blastosporas se obtuvieron mediante la inoculación de 10^6 células/ml en 1 litro de SDB y se incubó 24 horas a 24 °C. Posteriormente, se cosecharon las células por centrifugación durante 5 minutos a 2.500 g y se realizaron dos lavados con la solución PBS de Dulbecco. Del precipitado se
5 inocularon 10^6 células/ml en medio M199 y se incubaron a 37 °C durante 4 horas. A continuación se cosecharon los tubos germinales así obtenidos.

La Inactivación de *C. albicans* se llevó a cabo a partir de una suspensión de levaduras a una concentración de 10^7 células/ml que se mataron mediante exposición a
10 metaperiodato sódico 20 mM o 50 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente (Filler *et al.*, 1996 Infect Immun.; 64:2609-2617.) o por incubación a 70 °C durante 30 minutos en un baño termostatzado. La viabilidad de la suspensión celular se confirmó por extensión en placas de SDA.

15 **Análisis de la manosiación de la pared mediante citometría de flujo.**

Las levaduras de la cepa de *C. albicans* UPV1413 vivas o previamente tratadas con metaperiodato a concentraciones de 20 y 50 mM como se ha descrito previamente se centrifugaron y se resuspendieron a una concentración de 10^7 células/ml en TBS (*Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM, NaCl 150 mM*) + 1 mM (MgCl₂+MnCl₂+CaCl₂) y
20 Concanavalina-FITC (2 µg /ml) durante 30 minutos a 37 °C. Tras la incubación las células se centrifugaron y se resuspendieron en TBS para ser analizadas en el citómetro de flujo.

Las medidas de citometría se realizaron mediante el citómetro de flujo
25 FACSCalibur (Becton Dickinson). Las muestras se procesaron varias veces durante un tiempo predeterminado (1 minuto) para que los resultados fueran repetitivos y significativos. La

tasa de flujo fue determinada antes y después de cada sesión utilizando los tubos BD TruCOUNTM (Becton Dickinson). Posteriormente, los datos obtenidos fueron
30 analizados utilizando el programa de ordenador CellQuest software (V 3.3; Becton Dickinson).

Células del 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
5 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. *et al.* 1973. *Nature*, 242:148-149). Este tumor fue facilitado por la colección americana de cultivos tisulares.

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

15 **Obtención de células del ESH**

El hígado de ratones anestesiados se perfundió a través de la vena portal con la solución salina de Gey (GBSS) (pH 7,4) a 1,5 ml/minuto durante 3 minutos. Después, la digestión del tejido se llevó a cabo mediante perfusión *in situ* con 10 ml de solución A [GBSS 10 ml, Pronasa 0,1%] seguido de 15 ml de solución B [GBSS 15 ml,
20 Colagenasa 0,083% (p/v), Pronasa 0,033% (p/v)]. El hígado fue entonces troceado y mezclado en 13 ml de solución C [GBSS 13 ml, Colagenasa 0,038%, Pronasa 0,038%, DNasa I 0,0005% (p/v)] a 37 °C 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 1500
25 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 [GBSS 10 ml, Metrizamida 17,5% (2-(3-acetamida-5-metilacetamida-2,4,6-triodobenzamida)-2-desoxi-D-glucosa)]. A continuación, se recogieron las células
30 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 tripán y contaje 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 horas, las células aisladas se lavaron y se sembraron directamente.

Las células endoteliales recién aisladas en DMEM con 10% SBF fueron añadidas a placas de 24 pocillos bloqueadas con colágeno tipo I a razón de 106 células/ml por pocillo, y 2 horas 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 mg/ml estreptomicina a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante al menos 12 horas. Después de su puesta en cultivo, las células endoteliales se lavaron y se mantuvieron en medio sin suero durante al menos 4 horas 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

20 **Obtención y purificación del extracto crudo de *C. albicans***

Una vez cosechadas las células, éstas se resuspendieron en tampón de lisis (Molloy *et al.* 2000. *Annal Biochem*, 280:1-10). Posteriormente, se sonicó la suspensión con pulsos de 2 segundos a 60 W durante 10 minutos. Este proceso se llevó a cabo en un baño de hielo para evitar el calentamiento y la consiguiente degradación de la muestra. A continuación, se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 10.000 g para eliminar todos los restos celulares y se recogió sobrenadante al que se denominó extracto crudo.

Purificación de las manoproteínas procedentes del extracto crudo de *C. albicans*

30 Para separar las manoproteínas del extracto crudo de *C. albicans* se utilizó una columna de cromatografía de afinidad de Con-A Sepharosa, la cual estaba constituida por Concanavalina A (ligando) acoplada a una matriz de agarosa entrecruzada (Sepharosa 4B) activada con Bromuro de cianógeno (GE-Healthcare).

La Con-A Sepharosa vino suplementada con tampón acetato 0,1 M pH 6 (NaCl 1M, CaCl₂ 1mM, MnCl₂ 1mM y MgCl₂ 1mM). Se preparó una disolución que contenía 25% tampón de unión [*Tris-HCl (pH 7,4) 20 mM, NaCl 0,5 M, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM*] y 75% gel (suplementado) que se vertió en la columna. El volumen del lecho de la columna se lavó 10 veces con tampón de unión para eliminar el mertiolato (0,01%), y se terminó de rellenar la columna con tampón de unión para finalizar con el montaje de la parte superior de la columna. Tras conseguir una altura constante de columna, el flujo de mantenimiento se mantuvo tres veces el volumen del lecho de la columna, utilizando un flujo de 0,8 ml/minuto para empaquetar la columna.

A continuación, se cargaron en la columna un total de 90 mg de proteína disuelta en 30 ml de tampón de unión a una velocidad de flujo de 0,2 ml/minutos. La fracción no retenida en la columna se recogió haciendo pasar por ella 40 ml de tampón de unión. A esta fracción se la denominó fracción proteica (FP). La fracción retenida o fracción manoproteica (FMN) se eluyó de la columna pasando por ésta 40 ml de tampón de elución [*Tris-HCl (pH 7,4) 20 mM, NaCl 0,5 M, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, α -D-metilmanósido 0,5 M*].

Una vez finalizado el proceso, la columna de Con A-Sepharosa se regeneró mediante un lavado con tampón de regeneración [*Tritón-X 100 0,1%*] a 37 °C.

Cuantificación de proteínas y carbohidratos

La cuantificación de las proteínas se calculó mediante el RC/DC Protein Assay Reagent (Bio-Rad) utilizando distintas concentraciones de seroalbumina bovina como recta patrón.

La cuantificación de azúcares se llevó a cabo empleando el método de la antrona (Chung & Nickerson, 1954. J Biol. Chem, 208: 395-407) utilizando distintas concentraciones de manosa para elaborar la recta patrón.

Electroforesis preparativa

El aislamiento de las proteínas de interés se realizó mediante la 491 Prep. Cell (Bio-Rad) y el Econo-system (Bio-Rad) calculándose para cada banda las condiciones óptimas para su aislamiento que se resumen en la siguiente tabla:

Masa molecular	F1	F2	F3	F4	F5
	0-29KDa	29-45 KDa	45-66 KDa	66-116 KDa	>116 KDa
% T	12%	12%	10%	6%	3%
Altura gel	7 cm	7 cm	7,5 cm	8 cm	8 cm
Elución	0,5 ml/min	0,5 ml/min	0,5 ml/min	0,5 ml/min	0,5 ml/min
Fracciones	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml

5

Tabla 1: Condiciones utilizadas para el fraccionamiento del extracto crudo de la cepa de *C.albicans* UPV1413 mediante electroforesis preparativa en 5 subfracciones con diferente peso molecular.

10 Las electroforesis se realizaron con Tampón de electroforesis preparativa (10x) [Tris base 30,3 g/l, Glicina 144 g/l, SDS 10 g/l] y se migraron añadiendo 15 µl de Tampón de carga [β -Mercaptoetanol 50 µl, Glicerina 100 µl, Azul de Bromofenol Trazas] sobre 50 µl de muestra, en tubo de gel de diámetro interior 28 mm a 12 W como factor limitante, 50 mA y 300 V. Los tiempos de obtención de la proteína de

15 interés variaron de una electroforesis a otra por lo que en cada proceso de aislamiento se recuperaron 80 tubos que fueron analizados de cinco en cinco mediante tinción de plata en geles del 10% y 7,5% según el peso molecular de la proteína de interés a analizar. El análisis se realizó mediante la inoculación de 25 ml de muestra con tampón de carga en

20 interés, estos fueron analizados de uno en uno. Posteriormente las fracciones recogidas se dializaron frente a agua destilada y se liofilizaron.

Isoelectroenfoque preparativo en el Rotofor

25 El extracto crudo se dializó frente a agua y posteriormente se diluyó en agua destilada hasta alcanzar un volumen de 19 ml. Después, se añadió 1 ml (2%) de anfolitos del rango de pI en el que se quisieron separar las proteínas. Para ello, se utilizaron dos rangos, 3-10 y 3-5, para obtener dos fraccionamientos distintos. Las membranas de ambos electrolitos se equilibraron durante 24 horas en sus respectivos

tampones antes de realizar la separación isoelectroforética. La membrana de intercambio catiónico se equilibró en la solución de electrolito ácida [H_3PO_4 9,8 g/l] y la de intercambio aniónico en la solución de electrolito básica [$NaOH$ 4 g/l]. Las condiciones a las que se realizó el isoelectroenfoque preparativo fueron 12 W
 5 constantes durante aproximadamente 4 horas (hasta que se estabilizaron los voltios). La temperatura a la que se llevó a cabo el proceso fue de 4 °C.

SDS-PAGE (1D)

En la realización de la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE se
 10 emplearon los siguientes materiales:

–**Acrilamida/ Bis (30% T, 2,67% C):** Acrilamida 292 g/l, N'N'-bis-metilen-acrilamida 80 g/l (una vez preparado fue filtrado y almacenado a 4 °C).

–**Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8):** Tris(hidroximetil) aminometano 27,23 g, Agua desionizada 80 ml (el pH se ajustó a 8,8 con HCl 1N. Se llevó hasta 150 ml con
 15 agua desionizada y se almacenó a 4 °C).

–**Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8):** Tris(hidroximetil) aminometano 6 g, Agua desionizada 60 ml (el pH se ajustó a 6,8 con HCl 1N. Se llevó hasta 100 ml con agua desionizada y se almacenó a 4 °C).

–**Tampón de electrodo (pH 8,3):** Tris(hidroximetil) aminometano 3 g/l,
 20 Glicina 14,4 g/l, SDS 1 g/l.

–**Gel de apilamiento:** Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 2,5 ml, SDS al 10% 100 µl, Acrilamida/ Bis (stock al 30%) 1,3 ml, Agua destilada 6,1 ml (el gel fue suavemente agitado y se desgasificó durante 10 minutos a Tª ambiente. Después se añadió: Persulfato amónico al 10% 50 µl y TEMED 10 µl).

–**Gel de resolución (Acrilamida al 10%):** Tris-HCl 0,5 M pH 8,8 2,5 ml, SDS al 10% 100 µl, Acrilamida/ Bis (stock al 30%) 3,33 ml, Agua destilada 4,07 ml (el gel fue suavemente agitado y se desgasificó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se añadió: Persulfato amónico al 10% 50 µl y
 25 TEMED 10 µl).

30

Los distintos extractos proteicos fueron analizados mediante SDS-PAGE según el método de Laemli (1970) en el sistema Miniprotean 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 estándar de alto peso molecular HMW (Sigma) representados en la Tabla 2.

Proteína	PM
Miosina	205 kDa
α -galactosidasa	116 kDa
Fosforilasa B	97,4 kDa
Albúmina bovina	66 kDa
Ovoalbúmina	45 kDa
Anhidrasa carbónica	29 kDa

5

Tabla 2: Marcadores de peso molecular HMW.

SDS-PAGE (2D)

10 En la primera dimensión se emplearon los geles de isoelectroenfoque Immobiline DryStrips (Amersham) con gradiente inmovilizado de pH de 4-7 de una longitud de 7 cm.

15 Los geles IPG se cargaron con 150 μ g de muestra diluidos en 100 μ l de tampón de Rehidratación [*Urea 8 M, CHAPS 2% (p/v), Pharmalytes 2% (v/v), β -mercaptoetanol 2% (v/v), Azul de bromofenol 0,002%*] y se rehidrataron durante 12 horas en el Ettan IPGphor (Amersham). Las condiciones se muestran en la Tabla 3.

Voltios	Voltios / hora
500 V	500 V/h
1000 V	1000 V/h
5000 V	15000 V/h

Tabla 3: condiciones de Isoelectroenfoque.

20

Tras la separación por punto isoelectrico, se realizaron 2 incubaciones de 15 minutos en

tampón de equilibrado [*Urea 6 M, Tris-HCl (pH 8,8) 75 mM, Glicerol (87% p/p) 29,3% (v/v), SDS 2% (p/v), Azul de bromofenol 0,002%*]; la primera de ellas con ditiotreitolo (1%) y la segunda con iodacetamida (2%).

La separación de las proteínas en función de su peso molecular se realizó empleando dos sistemas:

–Miniprotean II (Bio-Rad) en las condiciones de 70 mA, 100 W y 200 V durante 1 hora. Para obtener una buena resolución, se utilizaron geles con una concentración de acrilamida del 10%; y

–Multiphor II, para lo cual se utilizaron geles de gradiente 8 – 18 (GE Healthcare). Las condiciones utilizadas se muestran en la Tabla 4:

Voltios	mA	W
600	20	30
600	40	30
600	40	30

Tabla 4: Condiciones de electroforesis

Los marcadores de peso molecular HMW (Sigma) empleados en la determinación de los pesos moleculares de las bandas se muestran en la Tabla 2.

Tinción de Coomassie G250

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

Tinción de plata

Inmediatamente después de la electroforesis los geles fueron tratados durante al menos 90 minutos en solución de fijación [*Etanol 500 ml/l, Acido acético 120 ml/l, Formaldehído (antes de usar) 50 µl/l*]. A continuación, se procedió a realizar tres lavados de 20 minutos con etanol al 30%. Tras someter a los geles a un pretratamiento con tiosulfato sódico pentahidratado (0,3 g/l) durante 1 minuto y lavarlos con agua desionizada tres veces durante 20 segundos cada vez, se incubaron durante 20 minutos en la solución de impregnación [*Nitrato de plata 0,2 g/l, Formaldehído (antes de usar) 0,75 ml/l*]. Por último, se lavaron los geles dos veces con agua desionizada y se les aplicó la solución reveladora [*Carbonato sódico 60 g/l, Tiosulfato sódico (antes de usar) 4 mg/l, Formaldehído (antes de usar) 0,5 ml/l*]. La detención del revelado se efectuó con la solución de parada [*Etanol 500 ml/l, Acido acético 120 ml/l*].

Detección de glicoproteínas mediante Concanavalina A

Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de PVDF en un sistema NovaBlot (GE Healthcare) en presencia de tampón de transferencia [*Glicina 14,41 g/l, Tris 3,025 g/l, Metanol 200 ml/l*] durante 1 hora para geles de 1D y 1 hora 30 minutos para geles de 2D a 400 mA y 60 V. Para comprobar que la electrotransferencia se había llevado a cabo correctamente, las membranas se tiñeron con una solución de Rojo Ponceau [*Rojo Ponceau 4 g/l, Metanol 450 ml/l, Ácido acético 100 ml/l*] para la visualización de las proteínas. La detección de glicoproteínas se realizó mediante Western blot utilizando Concanavalina A unida a peroxidasa (HRP) (Sigma). Después de la electrotransferencia se lavaron las membranas durante 1 hora con tampón TBS y se incubaron con TBSL durante 1 hora a 37 °C. A continuación se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno, los dos primeros con TBS [*Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM, NaCl 150 mM*] y el último con TBS + 1 mM (MgCl₂ + MnCl₂ + CaCl₂). Tras los lavados, se procedió a la incubación de las membranas Inmobilón-P (Millipore) (previamente tratadas en un disolvente orgánico (metanol) y posteriormente en agua desionizada) durante 1 hora a 37 °C con la lectina disuelta en tampón TBS + 1 mM (MgCl₂+ MnCl₂ + CaCl₂) a una concentración de 0,2 µg/ml. Por último, las membranas se lavaron durante 10 minutos tres veces con TBS. La reacción se mediante quimioluminiscencia (Millipore).

Western Blotting

La membrana previamente humedecida con metanol y agua miliQ se mantuvo durante 10 minutos en TBS antes de comenzar las incubaciones. Después se bloquearon los radicales libres con TBSL [TBS 100 ml, Leche descremada 5 g] 1 hora a 37 °C en agitación. Tras ello, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario (anti-mouse IL-1 β (R&D Systems)) en una dilución 1/500 en TBSL 1 hora a 37 °C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (anti-IgG-HRP) diluido 1/20000 en TBSL 1 hora a temperatura ambiente. Por último, las membranas fueron lavadas durante 10 minutos tres veces con TBS. La reacción se visualizó mediante quimioluminiscencia con el reactivo Immobilon western (Millipore) sobre láminas de película Curix RP-2 (Kodak).

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.

Identificación de las manoproteínas de la FMN3

La identificación de las manoproteínas de la FMN3 (45–66 kDa) se llevó a cabo mediante la técnica de huella peptídica MALDI-TOF MS en el servicio de proteómica del CIC Biogune (Zamudio) o mediante LC-MS/MS realizada en el servicio general de proteómica de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Los puntos se extrajeron a partir de un gel de poliacrilamida en 2D teñido con azul Coomassie G250. Los espectros obtenidos fueron analizados mediante las bases de datos del GenBank y Matrix Science.

Ensayo de adhesión tumoral inducida por *C. albicans*

La medida de la adhesión fue llevada 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-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM) en DMEM-HEPES (40 μ g/ml) y fueron incubadas durante 20 minutos a 37 °C. Después, las células fueron lavadas y resuspendidas en DMEM-HEPES a una concentración de 2×10^5 células/ml. La autofluorescencia del cultivo de ESH fue determinada.

Posteriormente, las células del ESH fueron incubadas con diferentes cepas y extractos de *C. albicans* (5×10^5 células/pocillo), FMN (2 µg carbohidrato/ml), EC (2 µg carbohidrato/ml), FP (2 µg proteína/ml) o manano comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (100 µg/ml) durante 8 horas. Las células del ESH no tratadas recibieron medio basal como control. Después de ser lavadas extensamente, las células MB16 marcadas con BCECF se añadieron al cultivo de 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 el fluorímetro de barrido en placa. A continuación, se realizaron tres lavados enérgicos de dichos co-cultivos, eliminando las células tumorales no adheridas a la monocapa de células endoteliales. Posteriormente, 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: $(A - C)/(B - C)$, donde A es la fluorescencia de las MB16 adheridas al ESH incubado *C. albicans*, B es la fluorescencia de las MB16 adheridas a las células del ESH no tratadas y C es la fluorescencia anterior a la adhesión de células tumorales.

Para bloquear el receptor de la IL-1 β o el receptor de manosa, se utilizaron el IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) (Amgen Biologicals) y el anti-receptor de manosa (anti mouse CD206) (Acris antibodies). Estas moléculas se añadieron 15 (IL-1Ra) o 30 (anti-MNR) minutos antes de la incubación del endotelio con las células o extractos de *C. albicans*.

Medida de la proliferación celular del melanoma B16 en respuesta a *C. albicans*

Se sembraron 2.550 células/pocillo (200 µl) en medio de cultivo con 10% SBF [Ácido. acético 1 ml, Agua destilada 99 ml, Sulforrodamina 0,4 mg]. La recta patrón que relaciona el número de células con la cantidad de fluorescencia emitida, se preparó a partir de la dilución seriada del MB16 desde una concentración de 675 hasta 80.000

células/pocillo (200 μ l) en una placa de 96 pocillos. Se utilizó medio de cultivo sin células para la medida del blanco. Tres horas después, cuando las células estuvieron adheridas a la placa, se añadieron 50 μ l de ácido acético al 64% sobre los pocillos que componían la recta patrón. Tras 1 hora de incubación, los pocillos se lavaron con PBS y se dejaron secar.

Al día siguiente se retiró el medio con SBF añadiéndose medio fresco sin SBF junto con los diferentes tratamientos (FMN a una concentración de 2 μ g carbohidratos/ml). La placa se incubó durante 48 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añadió sobre los pocillos 50 μ l de ácido tricloroacético al 64% durante 1 hora. A continuación, se lavaron con agua del grifo y se dejaron secar en la estufa a 50 °C durante 30 minutos. Seguidamente se añadieron 100 μ l/pocillo de solución de sulforrodamina durante 30 minutos, y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad. Después, se lavaron los pocillos con ácido acético al 1% y se volvió a secar la placa en la estufa a 50 °C durante 30 minutos. Por último, se añadieron 200 μ l de la solución Tris 10 mM pH 10,5 [*Tris 1,21 g/ml*] por pocillo y tras 5 minutos se realizó la lectura de la placa en un fluorímetro de barrido (Fluoroscán AFCENT) con un filtro de excitación de 530 nm, y de emisión de 620 nm.

Con los valores de fluorescencia obtenidos en la recta patrón, se construyó una recta de regresión, obteniéndose una ecuación que permitió relacionar la fluorescencia emitida con las células en función del número de células/pocillo.

Cuantificación de TNF- α

La concentración de TNF- α e IL-18 en los sobrenadantes se determinó utilizando un kit de ELISA comercial (R&D Systems) basado en anticuerpos monoclonales siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ensayos de adhesión tumoral inducida por *C. albicans* y de proliferación de células tumorales del melanoma B16 en respuesta a *C. albicans* (ambos descritos anteriormente) fueron realizados en colaboración con la empresa Pharmakine S.L.

Medida de la concentración de endotoxinas

Todos los procesos de obtención de células o extractos celulares realizados con la finalidad de comprobar el aumento de la adhesión tumoral que inducían fueron realizados con material estéril y libre de endotoxinas. Para comprobar la ausencia de estas en los extractos finales se utilizó el ensayo de lisis de *Limulus* (Associates of Cape
5 Cod, Woods Hole, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis estadísticos

Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) fueron calculadas según el test de la t de Student o mediante el test ANOVA seguido del test post-hoc de
10 Bonferroni según se muestra en las figuras.

II. RESULTADOS

Ejemplo 1

15 **Efecto de *Candida albicans* en la adhesión tumoral al ESH**

1. Efecto de la variación intraespecífica y del estado morfológico de diferentes cepas de *C. albicans* en la adhesión del MB16 sobre el ESH

Con el fin de aclarar el efecto que *C. albicans* ejerce en la adhesión tumoral al
20 endotelio sinusoidal hepático de ratón, se estudiaron diferentes cepas y estados morfológicos de las mismas. Como se puede observar en la Figura 1, tres cepas fueron utilizadas tanto en estado levaduriforme como tras haber inducido la formación de tubos germinales: La cepa de referencia NCPF3153 proveniente de una colección de cultivos tipo no mostró efecto significativo con respecto a la situación control. Por el contrario,
25 las dos cepas provenientes de la colección de la Universidad del País Vasco que fueron aisladas de pacientes con candidiasis demostraron una gran capacidad para estimular el ESH y aumentar la adhesión de células tumorales.

Ambas cepas, cuando se utilizaron en estado levaduriforme indujeron un aumento
30 de la adhesión de las células del MB16 al ESH que superó en más del 100% la adhesión producida en la situación control, es decir, sin *C. albicans*. Los resultados también nos mostraron que tras la incubación del endotelio con las levaduras, más del 85% de ellas había filamentado. Sin embargo, cuando se incubó el ESH con las cepas en morfología

de tubo germinal, germinadas previamente al ensayo, el aumento de la adhesión fue significativamente menor al inducido por las mismas cepas en estado levaduriforme, aunque también fue significativamente mayor al de la situación control.

5 Dado que el estado morfológico de *C. albicans* influyó en el modelo estudiado y que fueron las levaduras las que mayor aumento de la adhesión indujeron, a continuación se comprobó si este efecto proadhesivo que induce *C. albicans* es también dependiente de la viabilidad de las levaduras. Para ello, se utilizaron células viables y muertas por calor y por oxidación química con metaperiodato. Este punto es
10 particularmente interesante si tenemos en cuenta que las levaduras germinan durante la incubación con el ESH y que si este proceso es el determinante, las levaduras muertas no serían capaces de aumentar la adhesión tumoral al ESH.

En la Figura 2 se muestra como a pesar de estar muertas, las levaduras de la cepa
15 UPV1413 siguen provocando un aumento significativo de la adhesión de las células de B16 sobre el ESH. El aumento es de más del doble de células tumorales adheridas si se compara con la situación control. Concretamente, las células muertas tanto con calor como con metaperiodato a una concentración de 20 mM inducen un aumento de la adhesión tumoral de más del 100% comparando con el control, siendo mayor que el
20 producido por las células vivas. Lo cual supone que ni la viabilidad celular, ni el proceso germinativo son cruciales para inducir un aumento de la adhesión tumoral al ESH.

A pesar de que las células que fueron tratadas con metaperiodato a una
25 concentración de 50 mM redujeran su efecto en el aumento de la adhesión tumoral con respecto a las tratadas con una concentración de 20 mM, resulta llamativo que las levaduras muertas mediante el tratamiento con metaperiodato en ambas concentraciones mantuvieran capacidad de aumentar la adhesión tumoral al endotelio, ya que este tratamiento oxida los azúcares y es habitualmente utilizado para la eliminación de buena
30 parte de ellos de los extractos celulares.

Para terminar de corroborar que las levaduras son el estado morfológico más activo en este proceso, se probó la cepa NCPF3153 que no había mostrado influencia

alguna sobre la adhesión tumoral y su mutante agerminativa CA2. La Figura 2 muestra bien a las claras que la cepa CA2, que no es capaz de germinar, sí fue capaz de inducir un aumento significativo de la adhesión de células del MB16 sobre el ESH. Este aumento supuso casi el doble de células tumorales unidas con respecto a la situación control mientras que la cepa de referencia no tuvo ningún efecto.

La incubación del ESH con *C. albicans* provoca una mayor adhesión de las células del MB16 al endotelio. Este aumento depende tanto de la cepa que se utilice, como de su estado morfológico, siendo la morfología levaduriforme, tanto en estado vivo como muerto, la que mayor capacidad proadhesiva demostró.

2. Efecto de la oxidación química con metaperiodato sobre la morfología y la composición de la pared de *C. albicans*

Para comprobar que el tratamiento de las levaduras de *C. albicans* con metaperiodato eliminaba los carbohidratos de la superficie celular se utilizó un citómetro de flujo. La Citometría de Flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. La luz dispersada en ángulo cónico pequeño, llamada FSC (*Forward Scatter*), es una medida proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión. La luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (*Side Scatter*) es proporcional a la complejidad de la estructura interna de la partícula. El parámetro FL1 es proporcional a la fluorescencia de la partícula, en este caso debido al FITC.

Para realizar el experimento, las levaduras de *C. albicans* tratadas con metaperiodato 20 mM, 50 mM y sin tratar fueron marcadas con la lectina Concanavalina A, que tiene afinidad a los residuos α -manosilados, unida al fluorocromo FITC (Con A-FITC). En la Figura 3 se muestra un citograma de dispersión en donde se enfrentan la complejidad celular (SSC) con el tamaño (FSC), y un citograma mixto que enfrenta la fluorescencia (FL1) con el tamaño celular (FSC). Como se puede observar, las distintas poblaciones no varían en cuanto a tamaño ni a complejidad celular, sin embargo, si lo hacen en cuanto a fluorescencia. La población viva, no tratada con metaperiodato (R1), tiene una alta fluorescencia como consecuencia de que se le ha

unido la Concanavalina AFITC. Sin embargo, a medida que va aumentando la concentración del tratamiento con metaperiodato, la unión de la Concanavalina A se hace más difícil y la fluorescencia se reduce. Así pues, la población R2, tratada con 20 mM de metaperiodato, aparece con menor fluorescencia que las vivas, y la R3, tratada con 50 mM, prácticamente carece de fluorescencia ya que aparece con la misma fluorescencia que el ruido de fondo.

Conclusión: El tratamiento de las levaduras de *C. albicans* con metaperiodato elimina los azúcares de la superficie celular impidiendo la unión de la Concanavalina A. A pesar de ello, las levaduras mantienen capacidad de aumentar la adhesión tumoral al endotelio respecto al control.

3. Estudio de la composición carbohidrato/proteína de las cepas de *Candida albicans*

Las diferencias en la concentración de proteínas y carbohidratos entre las cepas podían dar una explicación sobre qué elementos de *C. albicans* son los principales responsables de su efecto en la adhesión tumoral al ESH. Para comprobarlo, se realizaron medidas de carbohidratos y de proteínas de cada una de las cepas en morfología levaduriforme y de tubo germinal.

20

Cepa	Proteína		Azúcar		Azúcar/proteína	
	Media	Desv.	Media	Desv.	Media	Desv.
NCPF3153	7,01	1,74	1,95	0,23	0,29	0,05
UPV1360	6,69	1,72	1,58	0,20	0,25	0,07
UPV1413	6,52	0,97	2,23	0,31	0,34	0,03
CA2	5,88	2,06	1,23	0,21	0,23	0,07
NCPF3153 (germinada)	10,31	4,78	2,22	0,47	0,19	0,06
UPV1360 (germinada)	13,38	3,82	1,50	0,44	0,10	0,02
UPV1413 (germinada)	9,98	4,90	1,64	0,35	0,17	0,06

Tabla 4

Como se observa en la Tabla 4, la medida de la concentración de carbohidratos por unidad celular entre las cepas no indicó diferencias que se pudieran relacionar con los distintos efectos mostrados en la adhesión tumoral. Sin embargo, la concentración

25

de proteínas aumentaba cuando la unidad celular era el tubo germinal y por tanto tenía una mayor biomasa que la levadura. Esto hace que en el cociente carbohidrato/proteína sea superior en levadura que en tubo germinal, y que esta diferencia sea significativa en algunos casos. Curiosamente esta diferencia es significativa en la cepa UPV1413 y en la
 5 UPV1360 que son las que mayor efecto en la adhesión tumoral a las células endoteliales habían mostrado (Figura 4).

Conclusión: El cociente carbohidrato/proteína es mayor en los blastoconidios de todas las cepas de *C. albicans* con respecto a los tubos germinales, siendo esta
 10 diferencia significativa en las cepas UPV1360 y UPV1413.

Ejemplo 2

Efecto de *Candida albicans* en la producción de IL-18

15 La IL-18 ha sido descrita como una molécula responsable de aumentar la adhesión de las células del MB16 al endotelio hepático murino y de incrementar la capacidad de metástasis de MB16 en hígado de ratón a través de la estimulación de la molécula VCAM-1 (Carrascal *et al.*, 2003. Cancer Research, 63: 49731-49734). Por este motivo, para comprobar que también es una de las citocinas que intervienen en el proceso
 20 desencadenado por *C. albicans*, se realizó una cuantificación de la producción de esta citocina tras la incubación del ESH con levaduras vivas y muertas mediante oxidación con metaperiodato a dos concentraciones distintas: 20 y 50 mM.

Como se puede observar en la Figura 5, *C. albicans*, a una concentración de 106
 25 células/ml, induce un aumento de la producción de IL-18 de aproximadamente el 100% con respecto a los valores de la situación control independientemente de si las levaduras están vivas o muertas. El aumento significativo de la producción de IL-18 se sigue manteniendo a pesar de reducir la concentración de levaduras hasta 105 cels/ml. En esta concentración, sin embargo, se puede observar que las levaduras muertas con
 30 metaperiodato de 50 mM tienen un efecto menor que las vivas y que las muertas con una concentración de 20 mM, poniendo de manifiesto la importancia de eliminar completamente los carbohidratos de la superficie celular de *C. albicans*.

Conclusión: *C. albicans* induce la producción de IL-18 en el ESH. Esta producción es dependiente de la concentración de células, así como de la concentración de carbohidratos presentes en la pared de la levadura.

5

Ejemplo 3

Estudio del efecto de las diferentes fracciones de *C. albicans* en la adhesión tumoral al ESH

1. Purificación de la fracción proteica y manoproteica

- 10 A continuación, dado que en la bibliografía se ha descrito un efecto en el aumento de la adhesión de células tumorales al ESH inducido por manano comercial (Mendoza *et al.* 1998. *J. Cell Physiol.*, 174: 322-330), y que las cepas usadas en este estudio son ricas en este polímero de manosa, se analizó si las manoproteínas de la cepa que mayor efecto había demostrado, la cepa UPV1413, eran las responsables de esta respuesta.
- 15 Para ello, se realizó una cromatografía de afinidad en columnas de Concanavalina A-Sepharose 4B para separar la fracción manoproteica (FMN) de la fracción no manoproteica se denominó fracción proteica (FP).

- Los resultados obtenidos, que aparecen reflejados en la Tabla 6, muestran un
20 rendimiento no muy elevado de la cromatografía. Sin embargo, teniendo en cuenta que los resultados que aparecen en la bibliografía con este tipo de columnas hablan de rendimientos del 60% (Rodrigo *et al.* 2003. *Biochem J.*, 376:261-268) en proteínas concretas y que nuestro extracto es muy complejo, los resultados se pueden dar como satisfactorios. Las FMN obtenidas tenían una concentración aproximada de 45 – 69% de
25 carbohidratos. Es decir, la fracción manoproteica obtenida de *C. albicans* posee una concentración ligeramente superior de carbohidratos que de proteínas.

Fracción	Proteína (mg/ml)	Desv.	MN (mg/ml)	Desv.
Crudo	26,08	3,88	8,92	1,24
FP	16,08	2,95	0,35	0,46
FMN	3,3	0,98	4,49	0,99
Rendimiento (%)	74,31		54,26	

Tabla 6: Resultados de cromatografía de afinidad en columnas de Concanavalina A. Se muestran como media de los resultados de las cromatografías y su desviación estándar.

5 **2. Efecto de la concentración de las fracciones de *C. albicans* en la adhesión tumoral al ESH**

Una vez obtenidas las fracciones, se pusieron en contacto con las células del endotelio y se observó que a concentraciones similares a las probadas en la bibliografía con manano comercial (0,1 mg/ml), las fracciones obtenidas en nuestro laboratorio resultaban ser tóxicas para las células (Figura 6). Para poder comprobar el efecto de las distintas fracciones obtenidas en la adhesión del MB16 al ESH se tuvo que diluir las muestras hasta 2 µg/ml e incluso 1 µg/ml. A esta concentración, las células del ESH no resultaron dañadas y el aumento de la adhesión tumoral fue similar al del manano comercial 100 veces más concentrado (0,1 mg/ml). El efecto observado al utilizar una concentración de manoproteínas de 2 µg/ml superaba en más del doble, es decir, más del 100%, el aumento de la adhesión tumoral con respecto a la situación control (Figura 7). Este aumento es similar al obtenido tras estimular el endotelio con las levaduras vivas de esta cepa.

20 **3. Efecto de las diferentes fracciones de *C. albicans* en la adhesión tumoral al ESH**

El siguiente punto a estudiar fue si el aumento del número de células tumorales adheridas al endotelio, como consecuencia de haber estado en contacto con *C. albicans*, era debido únicamente a sus manoproteínas. Para ello, se comparó el efecto de la FMN, la FP y del extracto crudo en el aumento de la adhesión del MB16 al ESH. Como se puede observar en la Figura 8, en el ESH estimulado con la FMN se produjo un aumento de la adhesión del MB16 significativamente mayor a la del control, de nuevo induciendo un aumento superior al 100%. Sin embargo, la FP no indujo un aumento significativo de la adhesión tumoral. El extracto crudo si aumentó ligeramente la adhesión tumoral, aunque el efecto fue inferior al producido por la FMN.

30

4. Efecto de las diferentes fracciones de *C. albicans* en la producción de TNF- α

La estimulación del endotelio provoca una cascada de citocinas, que termina con la expresión de moléculas de adhesión como pueden ser la VCAM-1 (Mendoza (citado *at supra*) 1998, Vidal-Vanaclocha *et al.* 2000. PNAS, 97: 734-739) en donde se

adhieren las células tumorales. Para saber si el proceso desencadenado por la FMN que daba como consecuencia el aumento de la adhesión de células del MB16 al ESH también estaba mediado por citocinas, se realizaron medidas de la concentración de TNF- α , la citocina que se describe como una de las primeras y más importantes que actúan en la cascada proinflamatoria descrita en el ESH.

Como se muestra en la Figura 8, la FP no fue capaz de estimular un aumento de la producción de TNF- α en el endotelio con respecto al control. Sin embargo, la incubación del endotelio tanto con el extracto crudo como con la FMN si indujo un aumento significativo en la producción de TNF- α comparado con la situación control. De nuevo, al igual que ocurrió con el aumento de la adhesión tumoral, la FMN mostró una mayor capacidad de inducir la producción de TNF- α que el extracto crudo ya que este no llegaba a inducir un aumento del 100% mientras que la estimulación con la FMN produjo aproximadamente un 120% de aumento de producción de TNF- α con respecto al control, llegando a valores de 220 pg/106 células.

Conclusión: La fracción manoproteica de *C. albicans* induce la adhesión de células tumorales al ESH a una concentración 100 veces más diluida que el manano comercial. En esta respuesta se produce TNF- α y resulta tóxica a concentraciones elevadas de extracto. Tanto la adhesión tumoral como el TNF- α aumentan en más del 100% con respecto al control cuando se estimula el ESH con la FMN.

Ejemplo 4

Efecto del receptor de manosa en la adhesión tumoral al ESH y la producción de IL-18

1.Efecto del receptor de manosa en la adhesión tumoral al ESH

Con la finalidad de demostrar si el aumento de la adhesión tumoral al endotelio estimulado por las manoproteínas de *C. albicans* estaba totalmente mediado en su punto inicial por el receptor de manosa, se utilizó un anticuerpo monoclonal capaz de bloquear la unión entre el receptor de manosa y sus ligandos. Por lo tanto, una inhibición total del aumento de la adhesión tumoral mediado por las manoproteínas de *C. albicans*

implicaría que toda la respuesta originada por *C. albicans* conllevaba en su inicio una activación de dicho receptor.

En la Figura 9 se puede observar que la utilización del anti-receptor de manosa redujo considerablemente el aumento de la adhesión tumoral al endotelio estimulado por *C. albicans* o sus manoproteínas. A medida que se aumentaba la concentración de este anticuerpo, la adhesión se reducía cada vez más, aunque no se consiguió eliminar completamente el efecto. De hecho, se comprobó que el aumento de la adhesión tumoral inducido por la enolasa recombinante, que era aproximadamente de un 40%, era independiente de la utilización del anti-receptor de manosa, como era de esperar ya que se trataba de una enolasa recombinante expresada en *E. coli* que no posee carbohidratos adheridos. Esto implica la activación del proceso por otro mecanismo independiente de este receptor. Además, *C. albicans* tratada con 50 mM de metaperiodato sódico, que elimina los carbohidratos de la superficie celular, aumenta aproximadamente un 40% la adhesión tumoral con respecto al control. Este efecto se mantiene, aunque de manera no significativa, a pesar de añadir el anti-receptor de manosa.

Conclusión: El receptor de manosa es el encargado de iniciar la mayor parte de la respuesta del ESH frente a *C. albicans* que desencadena un aumento de la adhesión tumoral, pero también existe un efecto independiente de él.

2. Efecto del receptor de manosa en la producción de IL-18

Como ya se ha comentado anteriormente en esta invención, la IL-18 ha sido descrita como una molécula responsable de aumentar la adhesión de células del MB16 al endotelio hepático murino en el proceso inflamatorio iniciado tras la estimulación del receptor de manosa que termina con la expresión de la molécula VCAM donde se unen las células tumorales. Así pues, para aclarar un poco más el efecto del receptor de manosa en este proceso, se estudió la producción de IL-18 por parte del ESH estimulado con *C. albicans* y sus manoproteínas, y se bloqueó el receptor de manosa para comprobar su influencia en la producción de esta citocina.

Como se observa en la Figura 10, la producción de IL-18 inducida por *C. albicans* o sus manoproteínas descendió significativamente al utilizar el anti-receptor de manosa.

Sucedió lo mismo cuando se utilizó la ovoalbúmina, una glicoproteína que bloquea los sitios de unión al endotelio tanto con su parte glicídica como proteica. Como se observa en la figura, la reducción de la producción de IL-18 fue significativa, entre un 45 y un 83% de inhibición del aumento de la producción de IL-18 inducido por *C. albicans* y sus manoproteínas en el endotelio. Tras el bloqueo con ambas moléculas la producción de IL-18 es superior a la situación control resultando significativa en el endotelio estimulado con *C. albicans* y bloqueado con el anti-MNR.

Conclusión: el anticuerpo anti-receptor de manosa reduce significativamente la producción de IL-18 por el ESH estimulado por *C. albicans*.

Ejemplo 5

Estudio bidimensional del extracto crudo, fracción proteica y fracción manoproteica de *C. albicans*

Con el objetivo de visualizar y caracterizar la composición peptídica de las fracciones obtenidas, se realizó la separación de las mismas mediante electroforesis bidimensional y después los geles obtenidos se tiñeron mediante tinción de plata ya que resulta más sensible que la tinción con azul de Coomassie y tiñe mejor las manoproteínas. Las figuras muestran que el extracto crudo posee proteínas repartidas a lo largo del rango de punto isoeléctrico comprendido entre 4 y 8, mientras que por peso molecular las proteínas de un tamaño mayor a 100 kDa no fueron detectadas.

La mayor densidad de moléculas se encontró situada entre 4,5 y 7 de punto isoeléctrico y entre 40 y 60 kDa de peso molecular (Figura 11(B)). También se observaron dos zonas importantes tanto por encima de 66 kDa como en los 27-30 kDa. Ambas con punto isoeléctrico aproximado de 5 (Figura 11 (A y C)). En la Figura 12 se muestra el resultado de la electroforesis bidimensional de la FP. Como se puede observar en ella, la mayoría de las moléculas que aparecían en gel del extracto crudo pertenecen a esta fracción, siendo prácticamente imposible identificar las proteínas que ya no aparecen debido a la alta densidad de proteínas contenidas. Sin embargo, se puede exceptuar la zona denominada A, que se sitúa entre 65 -75 kDa y 4,5-5 de punto isoeléctrico, la cual ha desaparecido casi por completo.

Como ya se ha observado en la Tabla 6, la cantidad de proteínas que contenía la FMN era aproximadamente 5 veces inferior a la cantidad que había en la FP. Esto supuso que para conseguir geles de la FMN en los que se pudieran visualizar sus manoproteínas, se tuvo que añadir una proporción 5 veces mayor de muestra. Por ello, las manoproteínas que aparecen en el gel de FMN no son visibles en el gel del extracto crudo, ya que su concentración en el es 5 veces inferior. La FMN mostrada en la Figura 13 posee una distribución mucho menos homogénea que las otras fracciones. Se observó que el número de manoproteínas en relación al total es pequeño y que se encuentran distribuidas en su práctica totalidad en las 3 áreas citadas anteriormente. Cabe destacar en este caso la zona A que está formada en su mayoría por manoproteínas, y que como se puede ver en la figura, es una de las zonas más importantes de la FMN.

Adicionalmente, resultó interesante observar como apareció en los geles realizados con la FMN una zona electrodensa, ácida y de muy alto peso molecular, que incluso sobrepasa los 200 kDa y que no había podido ser observada en las electroforesis realizadas con el extracto crudo (Figura 13 (D)).

Un western blot bidimensional del extracto crudo revelado con quimioluminiscencia utilizando Con A-HRP (Figura 14) muestra el alto grado de manosilación de las manoproteínas ácidas de alto peso molecular que no pudieron ser detectadas en la tinción de plata del extracto crudo pero que si se detectaron en el gel de la FMN y se denominaron como zona D. Además existen varias manoproteínas altamente manosiladas con un peso molecular de aproximadamente 45 kDa. A pesos moleculares inferiores, el bajo grado de manosilación no permitió que fueran detectadas.

Conclusión: La mayoría de las proteínas del extracto de *C. albicans* visualizadas mediante electroforesis bidimensional no están manosiladas. Para poder visualizar las manoproteínas mediante esta metodología es necesaria una purificación previa como la realizada en la presente invención.

Ejemplo 6**Análisis de subfracciones manoproteicas en la adhesión tumoral al ESH**

Una vez demostrado que la fracción manoproteica tiene un papel importante en el aumento de la adhesión tumoral al ESH inducido por *C. albicans* y que este proceso se produce mediante la activación de una cascada de citocinas entre las que se encuentran el TNF- α y la IL-18, el siguiente objetivo que se planteó fue el obtener distintas subfracciones manoproteicas que abarcaran distintos pesos moleculares y distintos puntos isoeléctricos. De esta forma, se consiguió concretar más el efecto de esta fracción. Es decir, si su efecto es generalizado o está concentrado en algunas manoproteínas.

1. Obtención de subfracciones manoproteicas de distinto peso molecular

Los resultados obtenidos de las purificaciones mediante electroforesis preparativa que aparecen en Tabla 7 mostraron un rendimiento total del proceso que va desde el 51,25% que se obtuvo si tenemos en cuenta las proteínas hasta el 80,53% que se obtuvo para los carbohidratos. Esta diferencia pudo ser debida a que las fracciones más complicadas de recuperar, las fracciones centrales, es donde se perdió más cantidad ya que hubo que desestimar los primeros y los últimos tubos de las fracciones porque estaban contaminados de las inmediatamente contiguas, y en estas fracciones la cantidad proteica era mayor que la manoproteica. Tras la separación del extracto crudo en 5 subfracciones de distinto peso molecular, estas fueron sometidas a una cromatografía de afinidad en una columna de Concanavalina A- Sepharosa como ya se ha descrito previamente para purificar la FMN.

25

Fracción	Proteína Inicio (mg)	Proteína final (mg)	Desv.	Proteína (%)	MN Inicio (mg)	MN final (mg)	Desv.	MN (%)
F1	40	9,37	0,75	23,43	12	1,03	0,01	8,58
F2	40	4,22	0,72	10,54	12	1,41	0,27	11,77
F3	40	2,66	1,16	6,64	12	1,81	0,92	15,12
F4	40	3,19	0,60	7,98	12	2,59	0,21	21,58
F5	40	1,06	0,07	2,66	12	2,82	0,07	23,48

5 Tabla 7: Resultados de la obtención de 5 subfracciones de distinto peso molecular mediante electroforesis preparativa a partir del extracto crudo: F1: 0 - 30 kDa, F2: 30 - 45 kDa, F3: 45 - 66 kDa, F4: 66 - 115 kDa, F5: <115 kDa. Se expresa como la media de los resultados obtenidos, su desviación estándar y el tanto por ciento del extracto crudo total que representa la cantidad recogida de cada fracción.

Fracción	Proteína inicio (mg)	Proteína final (mg)	Desv.	Proteína (%)	MN inicio (mg)	MN final (mg)	Desv.	MN (%)
FMN1	32,62	2,50	0,82	7,63	5	1,01	0,51	20,20
FMN2	13,82	2,50	0,65	10,66	5	1,40	0,09	27,92
FMN3	7,21	1,43	0,06	11,91	5	1,65	0,68	32,93
FMN4	5,83	1,23	0,21	25,17	5	1,70	0,49	33,90
FMN5	2,21	1,04	0,09	0,80	5	1,78	0,20	35,58

10 Tabla 8: Resultados de la obtención de las 5 subfracciones manoproteicas obtenidas mediante cromatografía de afinidad a partir de las obtenidas mediante electroforesis preparativa a partir del extracto crudo: FMN1: 0 - 30 kDa, FMN2: 30 - 45 kDa, FMN3: 45 - 66 kDa, FMN4: 66 - 115 kDa, FMN5: <115 kDa. Se expresa como la media de los resultados obtenidos, su desviación estándar y el rendimiento en tanto por ciento de la cromatografía.

15 Los resultados de las purificaciones obtenidas mediante cromatografía de afinidad de las fracciones separadas según su peso molecular para obtener sus respectivas fracciones manoproteicas nos mostraron, tal y como aparece en la Tabla 8, que los rendimientos eran inferiores a los obtenidos cuando se realizaban purificaciones del extracto crudo total. Esto pudo ser debido a que la cantidad de la que se partía era menor, y por ello cualquier pérdida que se producía a lo largo de la purificación o en su posterior diálisis y liofilización antes de la medida representaba un porcentaje mayor de pérdida. Curiosamente se obtenían además menores rendimientos cuanto menor era el peso molecular y la proporción de manosa/proteína de la fracción. En la Figura 15 se muestra el resultado de las fracciones obtenidas tras la separación por peso molecular del extracto crudo (A) donde se comprueba una excelente separación entre las fracciones. Además, en el Western Blot que se realizó después de la purificación mediante cromatografía de afinidad se sigue mostrando una muy buena separación entre las fracciones. Únicamente la fracción 2 se solapó en parte con la fracción 1 en ambos casos.

30

La Figura 16 representa la proporción Carbohidrato/Proteína de cada una de las fracciones obtenidas. Demuestra que las manoproteínas de mayor peso molecular se encuentran más manosiladas. Se observa que tanto la FMN1 como la FMN2 poseen una proporción mayor de proteína que de carbohidratos, mientras que la situación se invierte en las fracciones FMN4 y FMN5. La FMN3 posee una proporción más o menos igual de carbohidrato que de proteína.

2. Efecto de las diferentes subfracciones manoproteicas separadas según su peso molecular en la adhesión tumoral al endotelio sinusoidal hepático

Una vez realizada la correcta separación de la fracción manoproteica en 5 subfracciones de distintos pesos moleculares, se comprobó el efecto de cada una de ellas en la adhesión tumoral al endotelio. Para ello, con el fin de evitar que la diferencia entre el efecto de las distintas subfracciones fuera debida a la cantidad de carbohidrato presente en cada fracción, la concentración de las 5 subfracciones fue ajustada a la misma concentración de carbohidratos (2 µg/ml).

Tras la incubación del endotelio sinusoidal hepático con cada una de las subfracciones (Figura 17), el aumento de la adhesión tumoral fue significativamente mayor que en la situación control en 4 de las 5 subfracciones (FMN2, FMN3, FMN4 y FMN5), siendo tanto la FMN2 (30 – 45 kDa), como la FMN3 (45 – 66 kDa) las que más efecto tenían alcanzando aumentos de aproximadamente el 100% e incluso llegando al 150% en el caso de la FMN3.

Además, como se puede observar en la Figura 17, la FMN2 y la FMN3 indujeron un aumento de la adhesión tumoral significativo, del 35 y 60% respectivamente, con respecto al manano comercial, teniendo este último una concentración de carbohidratos 50 veces mayor.

3. Secuenciación de la FMN3

A tenor de los resultados obtenidos, existían diferencias entre las fracciones de distinto peso molecular que no tenían que ver con la concentración de carbohidratos. La FMN3 concretamente mostró un efecto muy importante y mayor que el resto de las fracciones manoproteicas obtenidas.

Por este motivo, se llevó a cabo la identificación de las manoproteínas más abundantes de la FMN3. Para lo cual se realizaron electroforesis bidimensionales que se tiñeron con azul de Coomassie y de donde posteriormente se identificaron las manoproteínas más representativas. Para la identificación se procedió a realizar un análisis mediante huella peptídica de los puntos que resultaron ser más intensos y repetitivos en geles de 2DE. En la Figura 18 se muestran los puntos de la FMN3 que fueron seleccionados para su identificación. La extracción de ellos se realizó manualmente y su identificación se realizó en el CIC Biogune (Zamudio).

10

La identificación de los 34 puntos que aparecen marcados en la Figura 18 dio como resultado una lista de 15 manoproteínas distintas que constituyen la FMN3 (Tabla 9).

15

Todas ellas se identificaron con una fiabilidad importante si tenemos en cuenta su puntuación o *score* y el cociente del número de péptidos detectados entre el número de péptidos totales de la proteína (columnas 6 y 7 respectivamente) a excepción del punto número 3, la proteína de Zinc (*Zinc Ring finger protein*), cuya identificación fue desestimada porque dio un *score* muy bajo y se detectaron pocos péptidos.

20

Entre las manoproteínas identificadas se repitieron muchas de ellas en isoformas contiguas de igual peso molecular pero con distinto punto isoeléctrico como en el caso de la aminopeptidasa, la fructosa bifosfato aldolasa, la alcohol deshidrogenasa o la enolasa. Estas dos últimas, además, presentaban subunidades en las que variaba tanto el peso molecular como el punto isoeléctrico. Este fue el caso también, por ejemplo, de la proteína disulfuro isomerasa. Muchas de las manoproteínas secuenciadas han sido previamente descritas en la bibliografía como antígenos. Tal es el caso de la cetoácido-reductoisomerasa mitocondrial, la proteína disulfuro isomerasa, la enolasa o la alcohol deshidrogenasa (Pitarch *et al.*, 2004. *Proteomics*, 4: 3084-3106).

NOMBRE	ID	Nº	MW	pI	SCORE	Pép. coincidentes/ Pép. totales
Disulfuro isomerasa	gi 68477899	1	49008	4,48	121	9/12
		2	46651	4,52	158	13/20
		4	64149	4,78	337	29/36
		5	63665	4,95	361	30/34
		6	60488	4,94	305	26/32
Proteína de Zinc (Zinc Ring finger protein)	gi 68478509	3	57360	4,67	68	5/10
Aminopeptidasa Y (APE3)	gi 68483101	7	69731	5,12	231	18/26
		8	68681	5,22	280	22/32
		9	68551	5,32	165	14/23
Cetoácido-reductoisomerasa mitocondrial	gi 68484035	10	51680	5,13	312	25/31
		11	49194	5,18	155	13/18
		32	51290	5,26	178	16/21
Factor de elongación Tu + factor de elongación de la traducción Tu	gi 66047777 + gi 68473812	12	57797	5,33	287 (150 + 98)	21/22
Actina	gi 68467327	13	57797	5,45	155	12/19
Enolasa	gi 68488457	14	58458	5,55	217	16/24
		15	56927	5,68	299	19/21
		16	53677	5,45	103	7/10
		17	49288	5,57	118	9/13
		21	44534	5,75	120	9/15
		23	46210	5,95	176	12/16
		26	56176	5,96	184	13/18
		33	49757	5,31	150	10/13
Alcohol deshidrogenasa (ADH1)	gi 68467815	18	52073	5,62	177	14/25
		20	51387	5,81	120	9/15
		22	45343	5,86	77	4/4
6-fosfogluconato deshidrogenasa (DOR 14)	gi 68467359	19	64393	5,99	147	12/14
Fructosa bifosfato aldolasa	gi 68466123	24	47634	6,05	168	11/15
		25	45257	6,15	306	25/34
3-fosfoglicerato quinasa	gi 68489602	27	57907	6,07	152	14/20
		31	57469	6,26	249	21/28
isocitrato deshidrogenasa	gi 68481517	28	51095	5,96	231	17/22
Alcohol deshidrogenasa 1 + GDP-manosa pirofosforilasa	gi 1168348 + gi 68490504	29	52470	6,06	278 (160 + 97)	22/28
Formaldehido deshidrogenasa dependiente de glutatión	gi 68473113	30	56604	6,16	83	6/7
Ubiquinol cit-c reductasa (core protein 2)	gi 68488175	34	47996	5,35	162	11/15

Tabla 9: Identificación mediante huella peptídica de las manoproteínas de *C. albicans* más importantes entre 45 y 66 kDa. El Mw y pI hacen referencia al peso molecular y punto isoeléctrico experimentales respectivamente.

5

4. Obtención de subfracciones proteicas de distinto punto isoeléctrico

Para poder concretar más en la búsqueda de las principales manoproteínas responsables de inducir el aumento de la adhesión tumoral al endotelio, se realizó una

separación del extracto crudo de *C. albicans* en cuatro subfracciones diferenciadas según el punto isoeléctrico, y de cada una de ellas se purificaron las manoproteínas mediante cromatografía de afinidad en columnas de Concanavalia A-Sepharosa como ya ha sido descrito previamente. Para la separación de las fracciones según su punto isoeléctrico se decidió utilizar el sistema Rotofor, el cual permite realizar isoelectroenfoque preparativo. La purificación de las fracciones manoproteicas según su punto isoeléctrico mediante el uso del Rotofor y cromatografía de afinidad es el mejor sistema para una separación preparativa según el pI de mezclas complejas de proteínas, pero aun así hay una pérdida notable de la cantidad de muestra por lo que los tantos por ciento de recuperación de las fracciones con respecto a la muestra inicial no fueron demasiado elevados.

	Proteína (mg)	MN (mg)		Proteína (mg)	MN (mg)
	<i>ROTOFOR</i>			<i>COLUMNA</i>	
Ext. inicio	100	32			
F1	4,60	5,49	FMN1	0,93	3,45
F2	3,50	1,85	FMN2	0,72	0,78
F3	4,80	1,47	FMN3	0,47	0,35
F4	11,80	1,41	FMN4	0,75	0,31
Total	24,70	10,21		2,87	4,89

Tabla 10: Resultado de las subfracciones obtenidas tras separar el extracto crudo de *C. albicans* según su punto isoeléctrico mediante el Rotofor y tras purificar esas fracciones mediante cromatografía de afinidad con Con-A.

Para la separación en base al punto isoeléctrico se utilizaron anfólicas de un rango de pH de 3 a 5,6, dejando en la última fracción todas las manoproteínas de mayor punto isoeléctrico, las cuales ya se había observado que no eran muy abundantes. Finalmente, los rangos de pI de cada una de las fracciones fueron F1: <4,25, F2: 4,25 – 5, F3: 5 –5,6, F4: >5,6.

En la Figura 19 se muestra el resultado de la separación del extracto crudo en las 4 subfracciones según su punto isoeléctrico y el resultado tras su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad en columnas de Concanavalina A-Sepharosa. La

separación fue satisfactoria y, como se puede ver en el western blot evaluado frente a Con A-HRP, las manoproteínas más manosiladas se encuentran en puntos isoeléctricos ácidos y de más de 45 kDa, mientras que a medida que va aumentando el punto isoeléctrico la mayor reacción se limita a una banda de 45 kDa. Estos resultados
5 coinciden con los obtenidos en el análisis realizado mediante electroforesis bidimensional del extracto crudo, FP y FMN de *C. albicans* del Ejemplo 5.

5. Efecto de las subfracciones manoproteicas de *C. albicans* en la adhesión tumoral al ESH

10 Tras la obtención de las 4 subfracciones de distintos puntos isoeléctricos, se analizó su efecto en la adhesión tumoral al endotelio. Para ello, al igual que se realizó con las fracciones separadas según su peso molecular, la concentración de las fracciones fue ajustada a la misma concentración de carbohidratos para evitar que la diferencia entre el efecto de las distintas fracciones fuera debida a la cantidad de carbohidratos
15 presentes en cada fracción.

Según los datos mostrados en la Figura 20, las manoproteínas que mayor importancia tienen en la adhesión tumoral están entre las manoproteínas identificadas como parte de la subfracción tres (FMN3) con un punto isoeléctrico aproximado entre 5
20 y 5,6. Por tanto, teniendo en cuenta tanto los resultados del fraccionamiento según el peso molecular como los obtenidos del fraccionamiento según el punto isoeléctrico, del total de manoproteínas identificadas que poseían pesos entre 45 y 66 kDa, las que mayor efecto en la adhesión tumoral ejercen son las que además fueron identificadas dentro del rango de punto isoeléctrico de 5 a 5,6. Esto reduce la lista inicial de 15
25 manoproteínas a un total de 7, de las cuales 4 han sido descritos con anterioridad como antígenos de *C. albicans*.

La Figura 21 muestra una reproducción visual del fraccionamiento de las manoproteínas de *C. albicans* realizado según el peso molecular y el punto isoeléctrico

NOMBRE	MW (Da) (teórico)	MW (Da)	pI (teórico)	pI
Aminopeptidasa Y	61100	69731	4,91	5,12
		68681		5,22
		68551		5,32
Cetoácido-reductoisomerasa mitocondrial	44935	51680	6,17	5,13
		49194		5,18
		51290		5,26
Factor de elongación Tu + Factor de elongación de la traducción Tu	43701 + 46904	57797	5,34/5,67	5,33
Actina	40382	57797	5,84	5,45
Enolasa	47202	58458	5,54	5,55
Ubiquinol cit-c reductasa (core protein 2)	39590	47996	5,45	5,35
Alcohol deshidrogenasa	46629	52073	8,44	5,62

Tabla 11: El Mw y pI hacen referencia al peso molecular y punto isoeléctrico experimentales respectivamente. Aparecen en letra negrita las manoproteínas descritas como antígenos.

5

En la Tabla 11 aparecen marcadas en letra negrita las manoproteínas que ya han sido descritas con anterioridad en la bibliografía como antígenos de *C. albicans*. Lo cual supone, que cuatro proteínas de las siete que componen este grupo son antígenos. Así pues este grupo de manoproteínas parece tener un alto potencial inmunogénico y puede que de activación endotelial. La alcohol deshidrogenasa y la aminopeptidasa fueron incluidas en la tabla por la importancia y su cercanía al rango de punto isoeléctrico y peso molecular respectivamente. Las cuatro manoproteínas que han sido descritas como antígenos reconocidos por sueros de pacientes son: la cetoácido-reductoisomerasa mitocondrial, la enolasa, la ubiquinol cit-c reductasa y la alcohol deshidrogenasa. Las 3 manoproteínas del grupo que quedan sin haber sido descritas como antígenos son la aminopeptidasa, que se encuentra entre la FMN3 y FMN4, la actina, que es una proteína que forma parte indispensable del citoesqueleto celular, y el factor de elongación Tu, que pertenece a una familia de proteínas que se las relaciona con antigenicidad, de hecho, algunos factores de elongación ya han sido descritos como antígenos de *C. albicans*.

20

Conclusiones: Las fracciones manoproteicas de *C. albicans* comprendidas entre 45 y 66 kDa según el peso molecular y entre 5 y 5,6 según el punto isoeléctrico son las

que más aumento de la adhesión tumoral al endotelio sinusoidal hepático inducen. En esa región se identificaron 7 manoproteínas, 4 de ellas, con potencial antigénico.

Ejemplo 7

5 Análisis bidimensional comparativo de las fracciones manoproteicas FMN3 de las distintas cepas

Se realizó un análisis comparativo de la expresión de los antígenos de la FMN3 entre las cepas de *C. albicans* UPV1413, UPV1360 y NCPF3153. La cepa UPV1413 fue elegida para el análisis por su alta capacidad para estimular la adhesión tumoral al endotelio, mientras que la cepa de referencia NCPF3153 se seleccionó por poseer la característica contraria, ya que no había mostrado capacidad de aumentar la adhesión de células tumorales al ESH. La cepa UPV1360 mostró capacidad de aumentar la adhesión tumoral, aunque en menor medida que la UPV1413. Para realizar el análisis se utilizaron como mínimo 3 geles de punto isoeléctrico comprendido entre 4 y 7 para cada cepa y se analizaron mediante el sistema informático Image Master 2D Platinum (GE Healthcare).

Como se puede observar en la Figura 22, los resultados mostraron pocas diferencias significativas en la expresión de los antígenos analizados. La mayor diferencia de expresión se encontró en la aminopeptidasa, la cual se expresaba como una de las proteínas más importantes de la FMN3 de la cepa UPV1413 y apenas se podía diferenciar en la FMN3 de la cepa NCPF3153. La aminopeptidasa no ha sido descrita en la bibliografía como antígeno de *C. albicans*. Su peso molecular se observó entre 68,5 y 69,7 kDa y su punto isoeléctrico entre 5,12 y 5,32, lo que la sitúan dentro de la fracción de punto isoeléctrico que había mostrado mayor capacidad de aumentar la adhesión tumoral a las células endoteliales, pero queda en el límite superior de la FMN3 en cuanto a las fracciones separadas según su peso molecular. Cuando se analizó la expresión de esta manoproteína en la cepa UPV1360, que si aumentaba la adhesión tumoral, en lugar de expresarse como lo hacía en la cepa UPV1413, su expresión disminuyó notablemente. Sucedió algo similar con la proteína disulfuro isomerasa, cuya expresión aparecía disminuida en la NCPF3153 con respecto a la UPV1413, y también

aparecía disminuida su expresión en la UPV1360 aunque mantenía la expresión por encima del nivel de la cepa de referencia.

El caso contrario se encuentra una de las subunidades de la enolasa. La cepa NCPF3153 y, sobre todo, la cepa UPV1360 expresaban en mayor proporción una de las subunidades de la enolasa, concretamente la más básica de ellas, la cual no había sido identificada en la cepa UPV1413. Por tanto, se han encontrado diferencias de expresión en tres manoproteínas de la FMN3 como son la enolasa, la proteína disulfuro isomerasa y la aminopeptidasa, aunque no podemos relacionarlo claramente con un mayor aumento de la adhesión tumoral al ESH. Sin embargo, el hecho de que tanto en la cepa UPV1413 como en la UPV1360 se expresen dos de estas tres proteínas, en la primera la proteína disulfuro isomerasa (A) y la aminopeptidasa (C), y en la segunda la proteína disulfuro isomerasa (A) y la subunidad básica de la enolasa (B), en mayor medida que en la cepa referencia y en todos los casos estudiados, nos permite suponer algún efecto de las mismas en el incremento de la adhesión tumoral.

Conclusión: El análisis bidimensional de la FMN3 de las distintas cepas aporta diferencias de expresión significativas entre cepas de *C. albicans* que inducen un efecto en el aumento de la adhesión tumoral al endotelio de las cepas que no lo inducen.

20

Ejemplo 8

Estudio del efecto de la fracción manoproteica DE *C. albicans* en la proliferación tumoral

En la presente invención ha quedado demostrado el efecto de las manoproteínas de *C. albicans* en el aumento de la adhesión tumoral al endotelio hepático. Para eliminar un posible efecto directo de las manoproteínas de *C. albicans* sobre las células tumorales B16, además de sobre el endotelio, se midió si es posible inducir alguna variación en la proliferación de las células tumorales. Por ello, se midió la proliferación de las células MB16 inducida por la fracción manoproteica de *C. albicans* a 24 y 48 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 23. En ella se aprecia que las células MB16 incubadas con la fracción manoproteica no tuvieron una mayor tasa de proliferación que las células control. A pesar de que a las 24 horas si se produjo una

30

proliferación mayor que el control, esta no se corroboró a las 48 horas. En ambos casos, la proliferación inducida por la fracción manoproteica fue menor que la inducida por el suero bovino fetal.

5 Estos resultados fueron corroborados tras realizar la prueba utilizando la FMN3 (45-66 kDa) para estimular la proliferación. Aunque en este caso, los resultados mostrados en la Figura 24 indican que la FMN3 aumenta la proliferación con respecto a la situación control, también demuestran que la FMN3 de *C. albicans* no posee capacidad de inducir la proliferación de las células tumorales tanto como el medio
10 suplementado con SBF o que el manano comercial.

Conclusión: La fracción manoproteica de *C. albicans* no induce un aumento significativo de la proliferación de las células tumorales MB16.

15

Ejemplo 9

Influencia del receptor de la IL-1 β en la adhesión tumoral y producción de TNF- α inducida por la FMN

La IL-1 β es una molécula proinflamatoria que está relacionada con el TNF- α ya
20 que ambas participan en la repuesta proinflamatoria del endotelio y, según la bibliografía, en la respuesta proinflamatoria que se activa a través del receptor de manosa, la síntesis y liberación de TNF- α es previa a la de IL-1 β (Vidal-Vanaclocha *et al.*, 2000 citado *at supra*).

25 El presente experimento se realizo con una molécula antagonista del receptor de la IL-1 β llamada IL-1Ra (IL-1 *Receptor antagonist*) que ya ha sido utilizada para tal efecto (Vidal-Vanaclocha *et al.* 2000). Mediante esta molécula se bloqueó el receptor de la IL-1 β y se midió la repercusión que esto tiene en el aumento de la adhesión tumoral y la producción de TNF- α liberado por el endotelio cuando se incubaba con las
30 manoproteínas de *C. albicans*.

En la Figura 25 se demuestra que el bloqueo del receptor de la IL-1 β inhibió completamente el efecto que las manoproteínas tienen en la adhesión tumoral. Mientras que la adhesión de células tumorales aumentó un 60% cuando el endotelio está activado con la FMN, este efecto quedó completamente inhibido cuando se neutraliza la función del receptor de la IL-1 β . Esto implica que las manoproteínas de *C. albicans* desencadenan la cascada o bien en ese punto, o con anterioridad a ese receptor. Sorprende sin embargo, que la producción de TNF- α también disminuyó significativamente cuando se bloquea el IL-1R. La liberación de TNF- α que se podría esperar que no se viera afectada si la vía de actuación de las citocinas fuera exclusivamente el receptor de manosa también se vio reducida. En este caso al contrario de lo que sucedió con la adhesión tumoral, la reducción no fue total, y mantuvo, a pesar de la disminución, una producción de TNF- α significativamente mayor a la situación control.

A la vista de los resultados obtenidos, se planteó la posibilidad de la existencia entre estas manoproteínas purificadas de *C. albicans* de alguna que pudiera unirse a este receptor y activarlo directamente. Por ello, para intentar identificar alguna manoproteína relacionada con la activación del receptor de la IL-1 β , se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-mouse IL-1 β (R&D systems) que reacciona frente a la IL-1 β de ratón neutralizando su función biológica y, por tanto, impidiendo que esta se una a su receptor. Partiendo de la idea de que para neutralizar específicamente la función biológica de la IL-1 β el anticuerpo podría reconocer el epitopo que la citocina utiliza para unirse con su receptor, se utilizó éste anticuerpo para reconocer también, si existiera, alguna manoproteína de *C. albicans* capaz de unirse y activar el IL-1R. Con este objetivo se realizó un Western blot bidimensional de las manoproteínas de *Candida* frente al anticuerpo anti-mouse IL-1 β .

El anticuerpo anti IL-1 β reconoció una manoproteína que por peso molecular coincidía con la fracción FMN3, descrita en esta invención como la que más capacidad poseía para estimular el ESH e inducir un aumento de la adhesión tumoral a este endotelio. Además, su peso molecular, se sitúa aproximadamente en la zona que ha servido de límite entre la FMN3 y la FMN2, la cual también mostró un importante

efecto. Atendiendo a su punto isoelectrico, la manoproteína también se detectó dentro del rango de la fracción que mostró más efecto. Por tanto, esta manoproteína era una importante candidata a ser estimuladora del endotelio y, por tanto, del aumento de la adhesión tumoral al mismo.

5

La reacción obtenida fue reproducible en todos los Western blot realizados. Sin embargo, dicha reacción no aparecía claramente visible en los geles teñidos con azul de Coomassie (Figura 26). A pesar de ello, el fragmento de gel que daba reacción se extrajo manualmente y se secuenció mediante LC-MS/MS en el servicio de proteómica de la UPV/EHU.

10

Conclusión: El antagonista del receptor de la IL-1 β (IL-Ra) inhibe totalmente el aumento de la adhesión tumoral al endotelio sinusoidal hepático inducido por la FMN. Además, reduce en parte la liberación de TNF- α por el endotelio estimulado por las manoproteínas de *C. albicans*.

15

REIVINDICACIONES

1. Empleo de un anticuerpo con capacidad de unión a la manoproteína alcohol
5 deshidrogenasa de *Candida albicans*, o a una variante funcionalmente equivalente de la misma, y bloquear la unión de dicha manoproteína, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, a su receptor en las células endoteliales, en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de un proceso metastático.
- 10 2. Empleo según la reivindicación 1, en donde la manoproteína procede de la fracción manoproteica de *C. albicans*.
3. Empleo según la reivindicación 1, en donde dicho receptor en las células
15 endoteliales es un receptor de manosa, o un receptor de una citoquina proinflamatoria, preferentemente, el receptor de la interleuquina 1 beta (IL-1 β).
4. Empleo según la reivindicación 1, en donde dicho proceso metastático se origina a partir de tumor de hígado.
- 20 5. Empleo según la reivindicación 3, en donde dicha composición farmacéutica comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
6. Un método para identificar un compuesto potencialmente útil para la prevención
25 y/o el tratamiento de un proceso metastático, que comprende poner en contacto la manoproteína alcohol deshidrogenasa de *Candida albicans*, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, con su receptor en las células endoteliales, y seleccionar un compuesto que bloquea la unión de dicha manoproteína, o variante funcionalmente equivalente de la misma, a dicho receptor en las células
30 endoteliales.
7. Método según la reivindicación 6, en donde dicha manoproteína alcohol deshidrogenasa de *Candida albicans* procede de la fracción manoproteica de *C. albicans*.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en donde dicho receptor de las células endoteliales es un receptor de manosa o un receptor de una citoquina proinflamatoria, preferentemente, el receptor de la interleuquina 1 beta (IL-1 β).
- 5
9. Método según la reivindicación 6, en donde dicho proceso metastásico se origina a partir de tumor de hígado.
10. Uso de un kit que comprende un anticuerpo con capacidad de unión a la manoproteína alcohol deshidrogenasa de *Candida albicans*, o a una variante funcionalmente equivalente de la misma, y bloquear la unión de dicha manoproteína, o variante funcionalmente equivalente de la misma, a su receptor de las células endoteliales, para la prevención y/o tratamiento de un proceso metastásico.
- 10
11. Uso según la reivindicación 10, en donde dicha manoproteína procede de la fracción manoproteica de *C. albicans*.
- 15
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en donde dicho receptor en las células endoteliales es un receptor de manosa o un receptor de una citoquina proinflamatoria, preferentemente, el receptor de la interleuquina 1 beta (IL-1 β).
- 20
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde el proceso metastásico se origina a partir de tumor de hígado.
- 25
14. Un método *in vitro* para pronosticar la probabilidad de un paciente que padece cáncer a sufrir metástasis, que comprende la detección en una muestra de dicho paciente de la manoproteína alcohol deshidrogenasa de *Candida albicans*, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, en donde si dicha manoproteína, o variante funcionalmente equivalente de la misma, es detectada, entonces dicho paciente tiene una alta probabilidad de sufrir metástasis.
- 30
15. Un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada a un paciente que padece cáncer que comprende la detección en una muestra de dicho paciente de la manoproteína alcohol deshidrogenasa de *Candida albicans*, o una variante

funcionalmente equivalente de la misma, en donde si dicha manoproteína, o variante funcionalmente de la misma, es detectada, entonces el paciente es candidato a recibir un tratamiento basado en un anticuerpo con capacidad de unión a dicha manoproteína, o a una variante funcionalmente equivalente de la misma, y
5 bloquear la unión de dicha manoproteína, o variante funcionalmente equivalente de la misma, a su receptor en las células endoteliales.

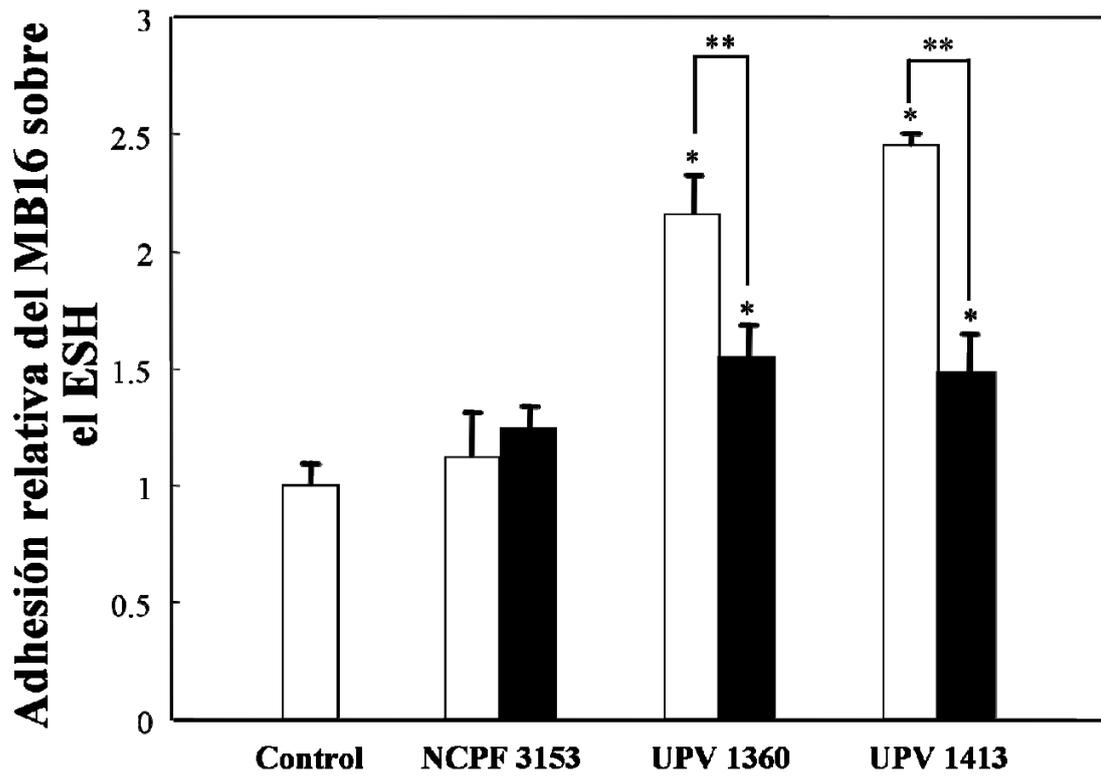


FIG. 1

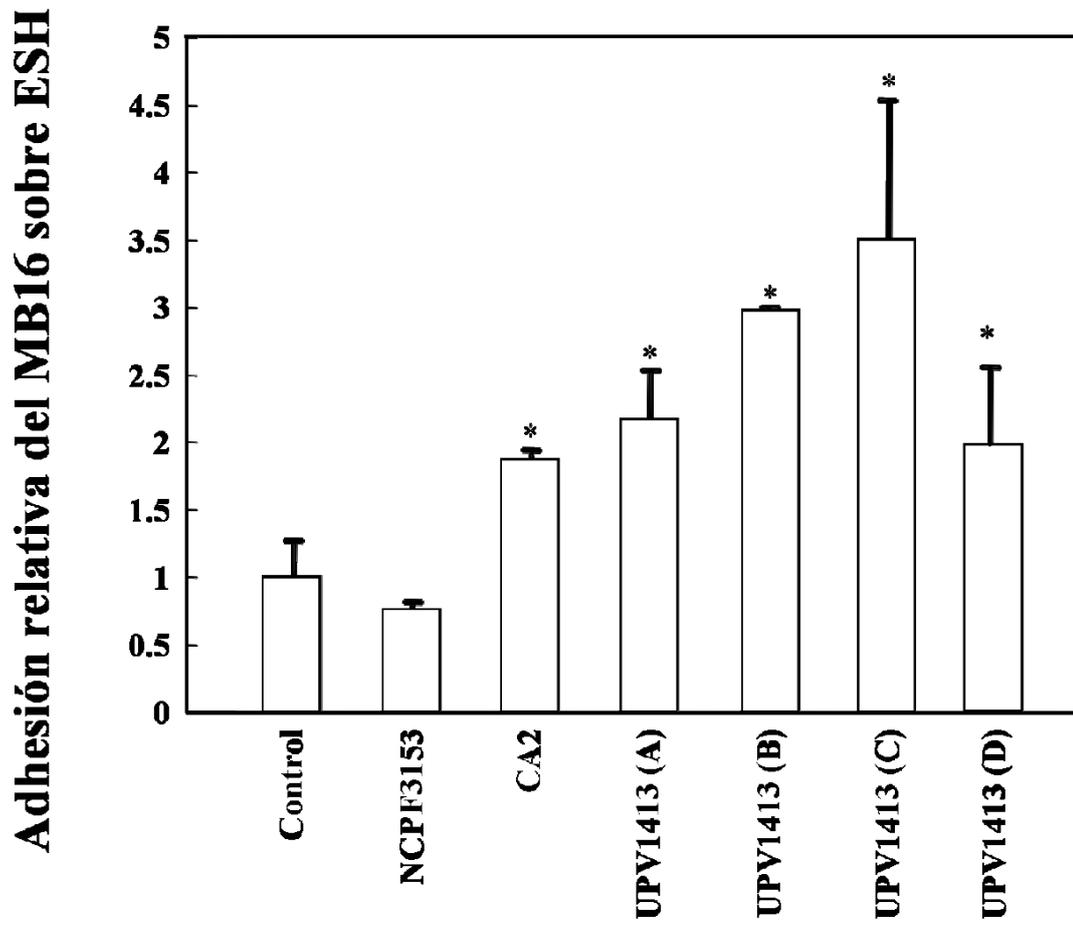


FIG.2

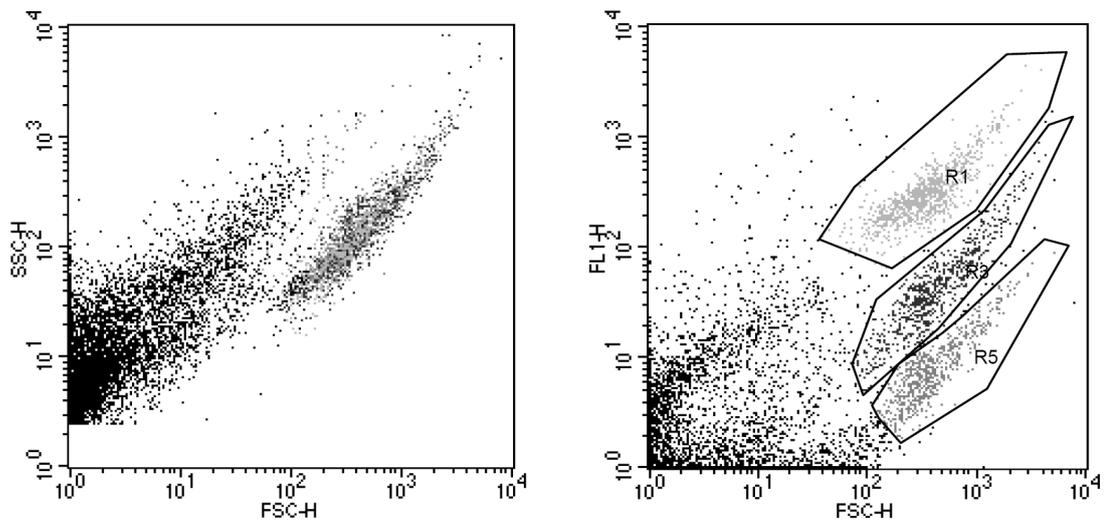


FIG. 3

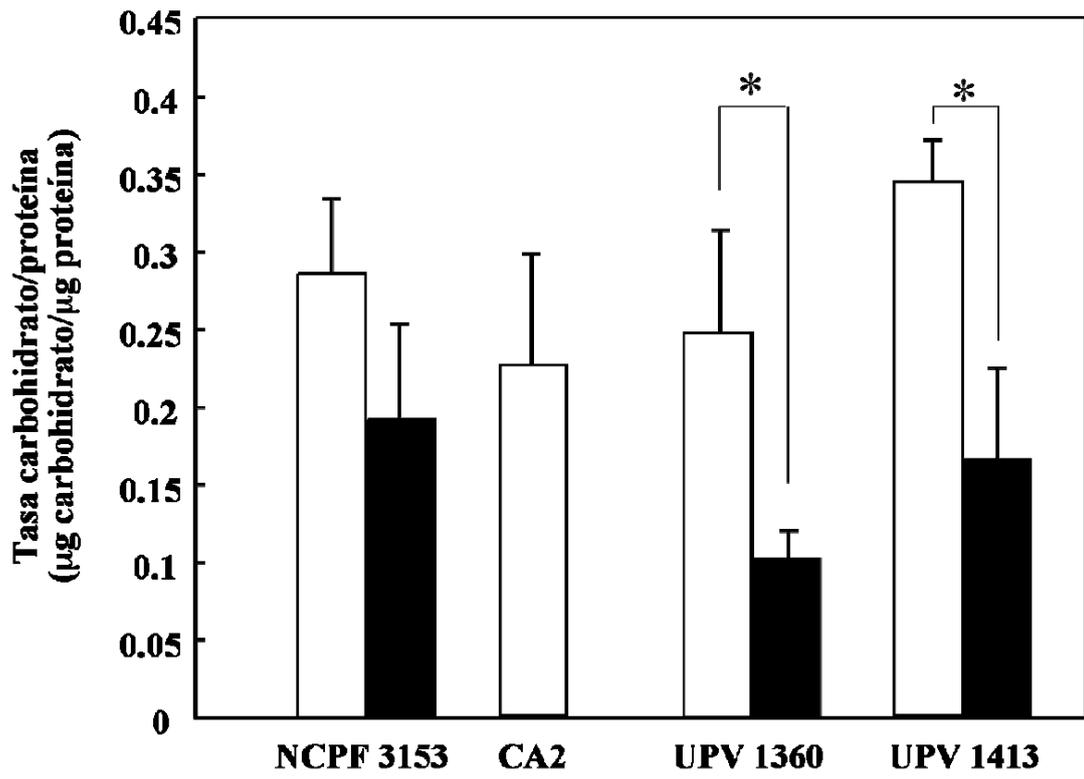


FIG. 4

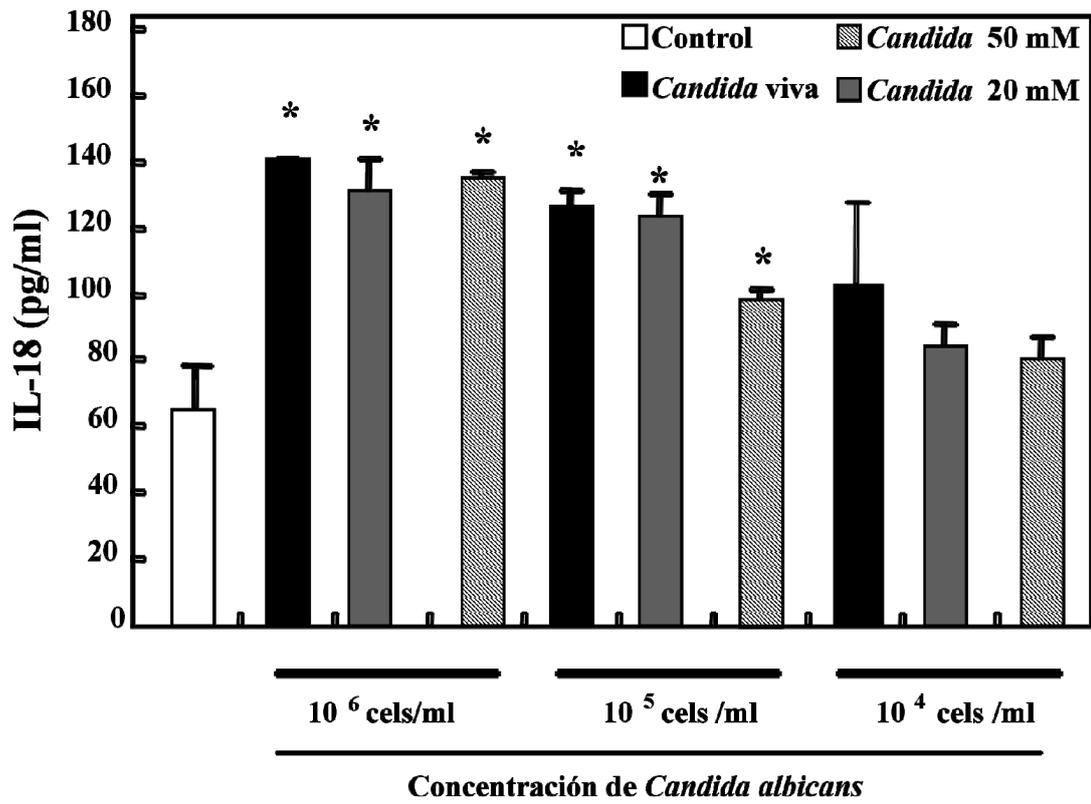


FIG. 5

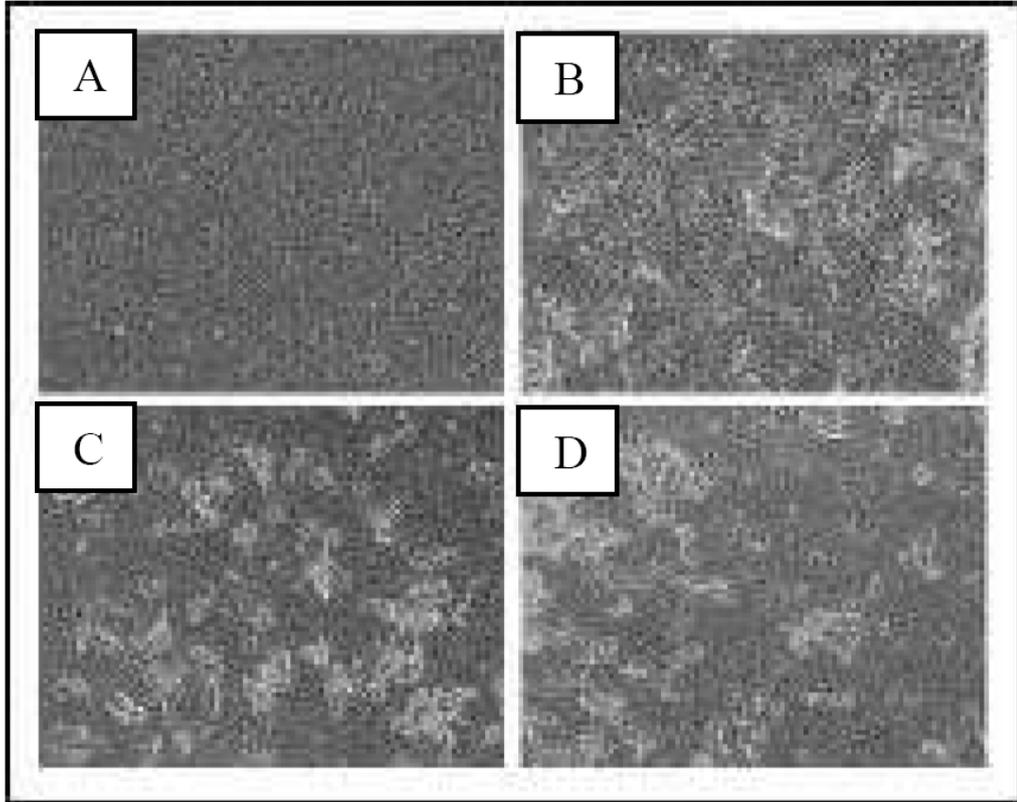


FIG. 6

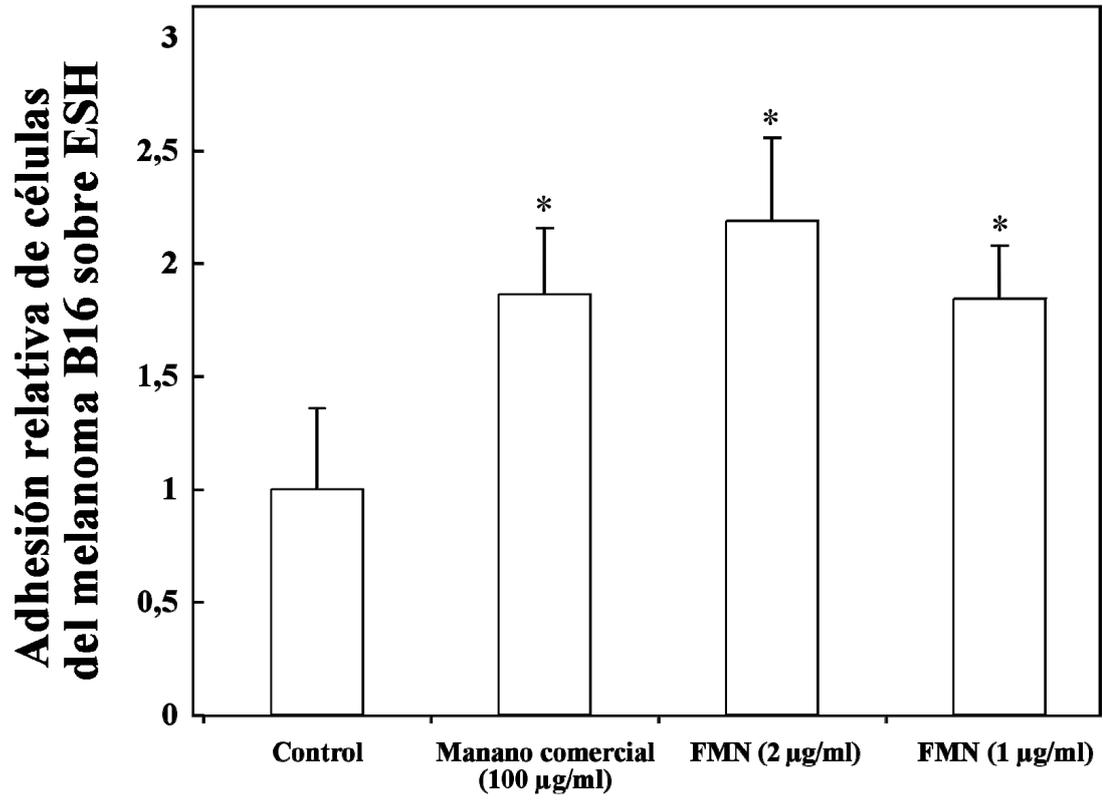


FIG. 7

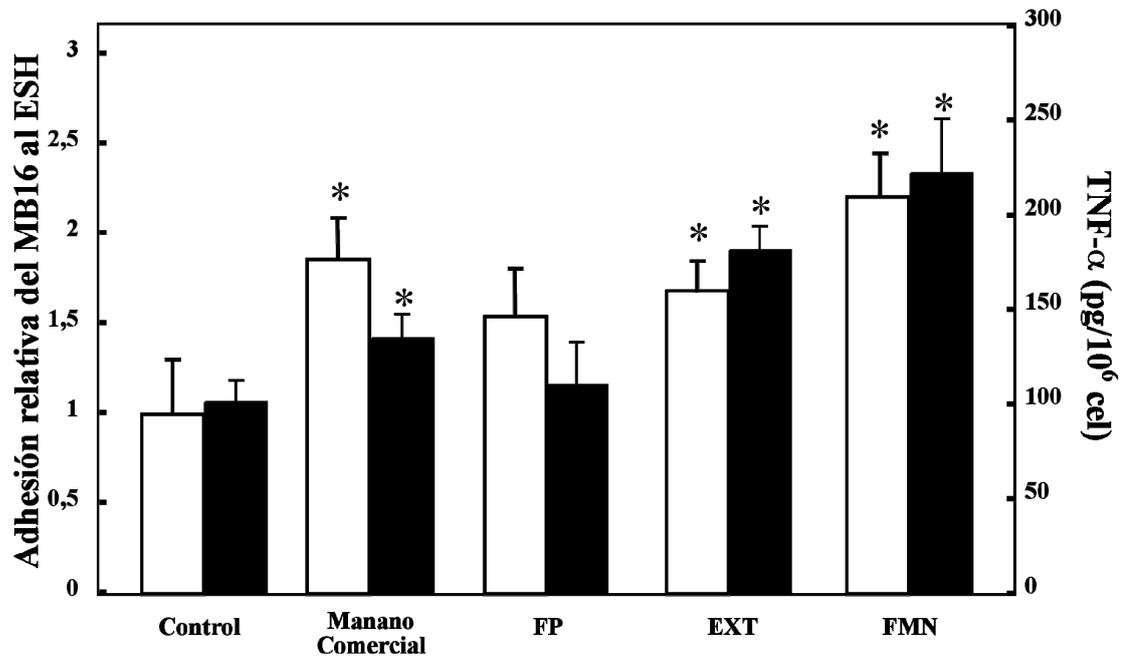


FIG. 8

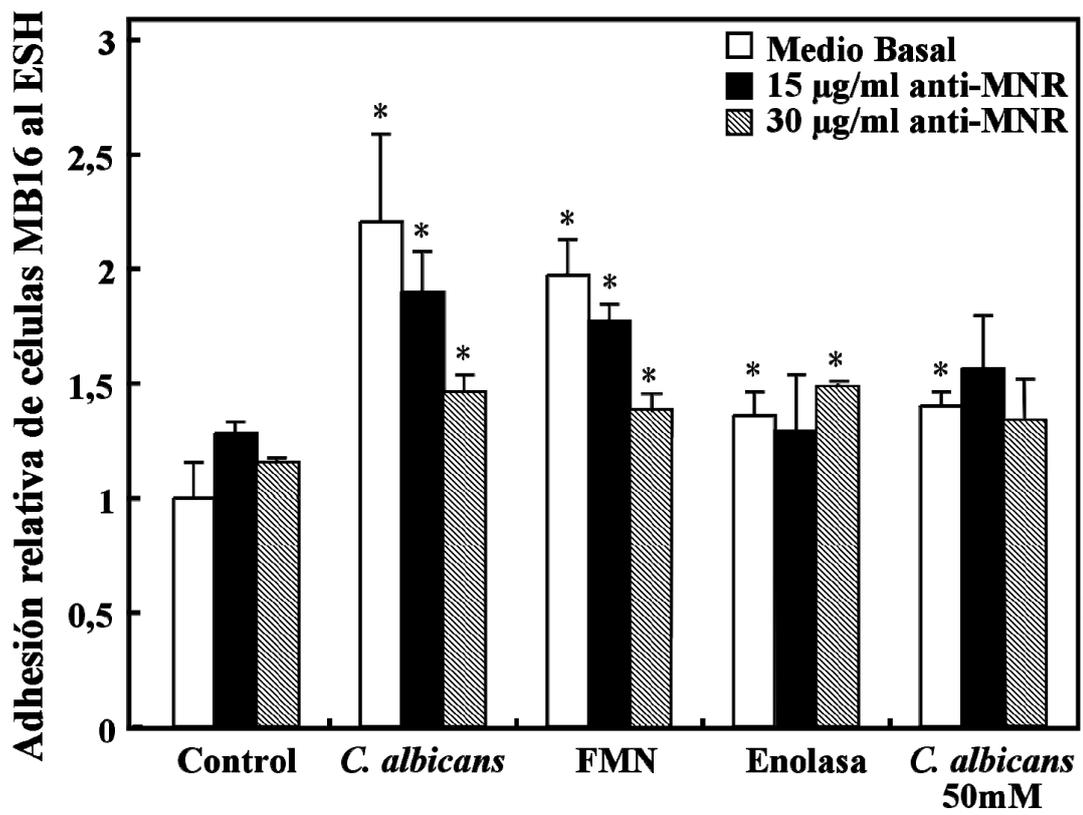


FIG. 9

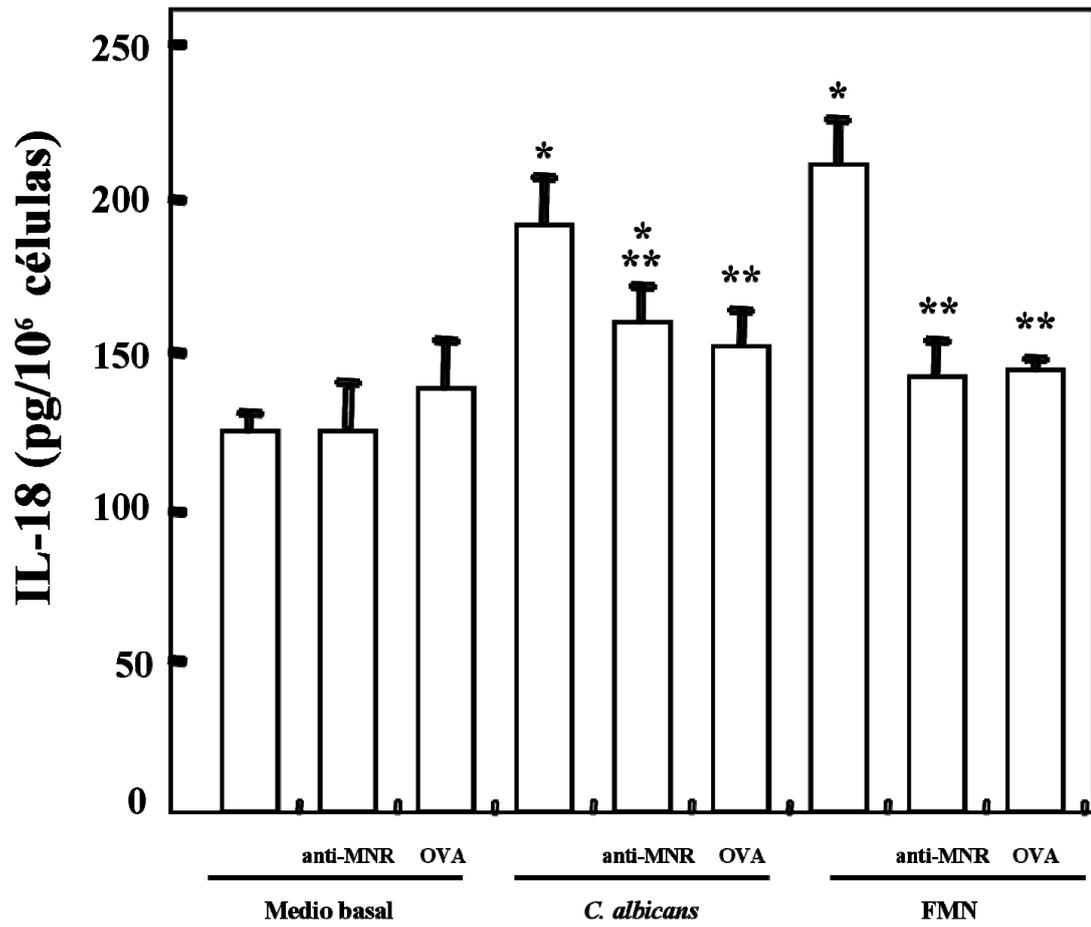


FIG. 10

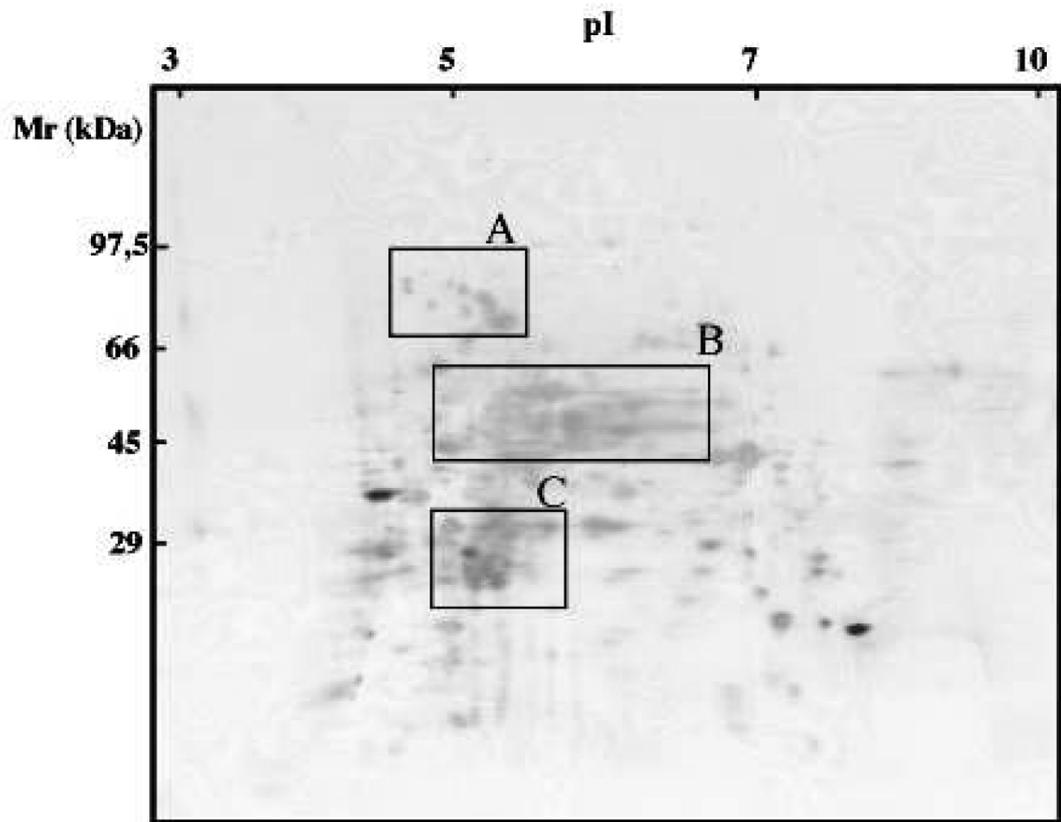


FIG. 11

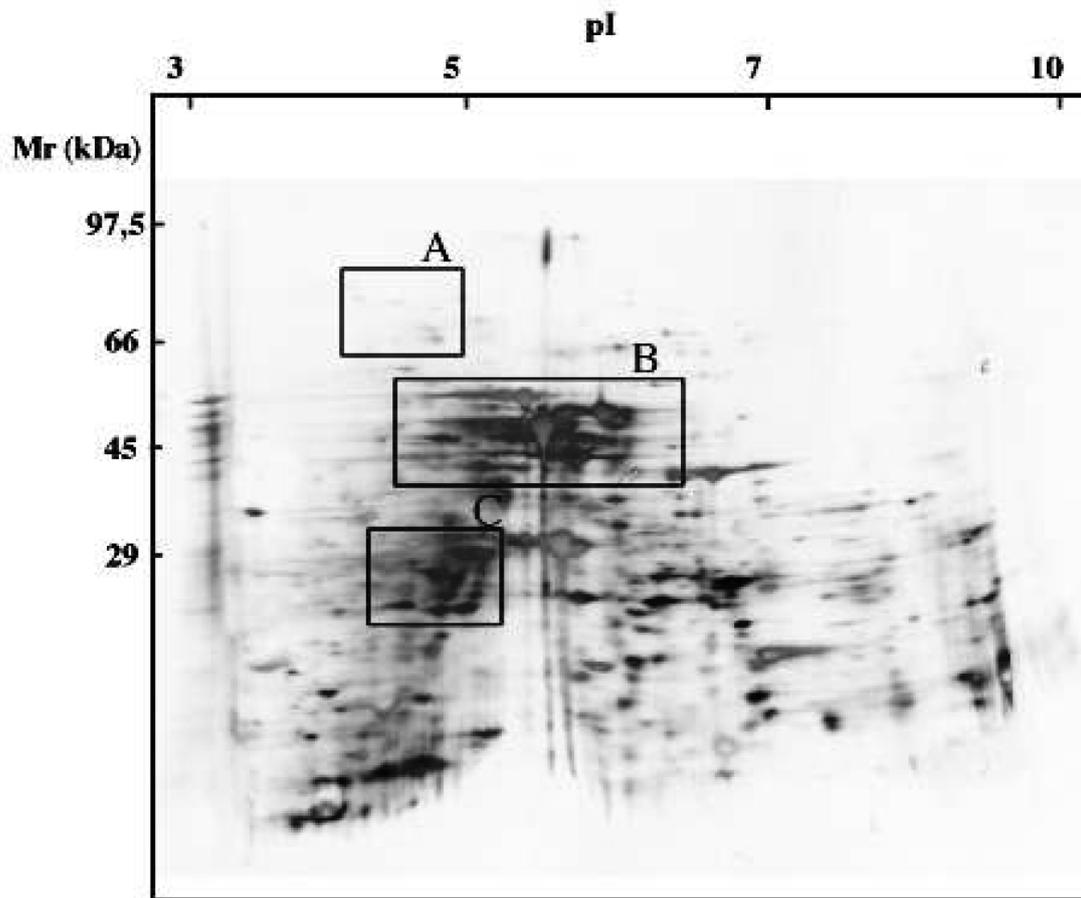


FIG. 12

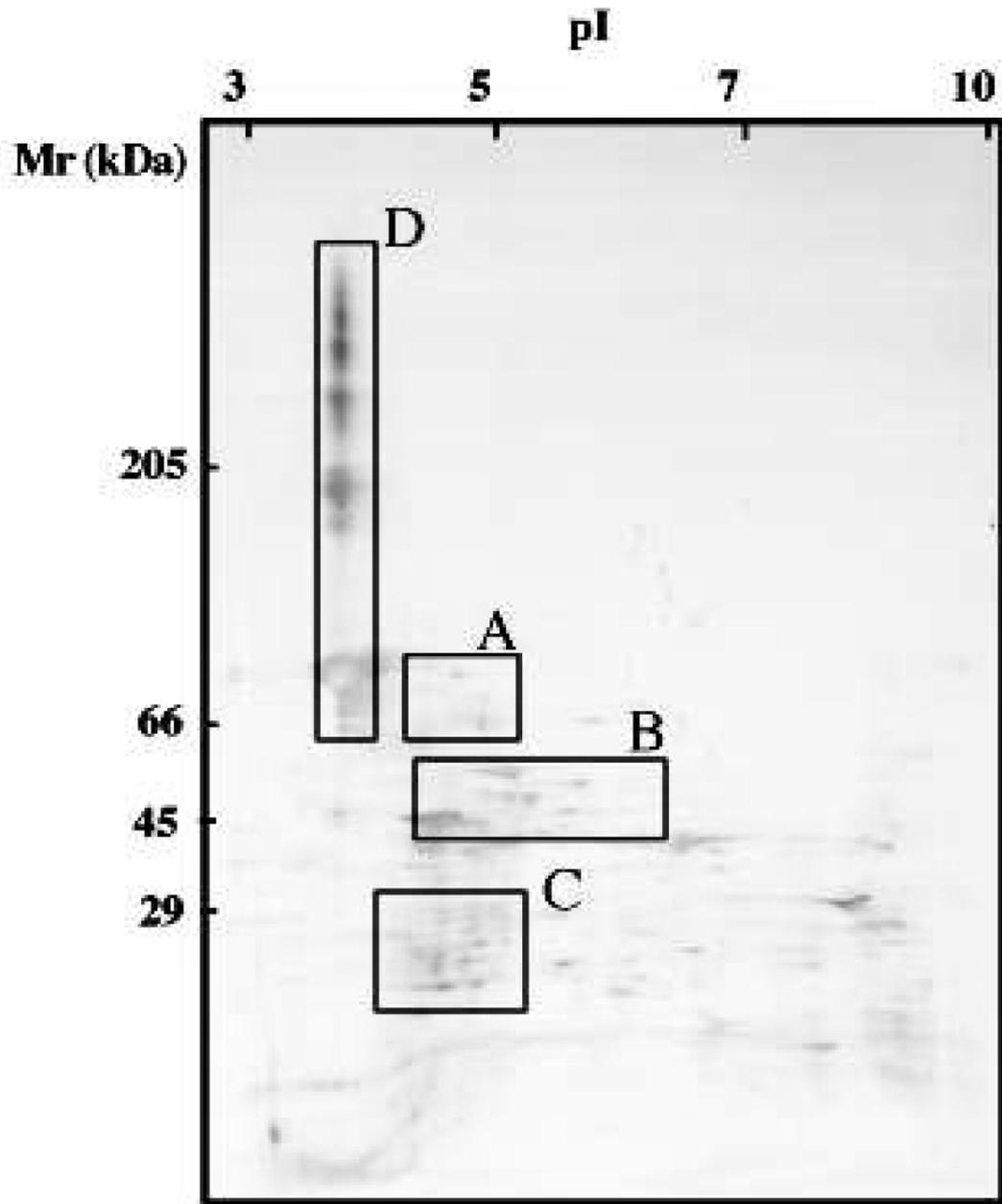


FIG. 13

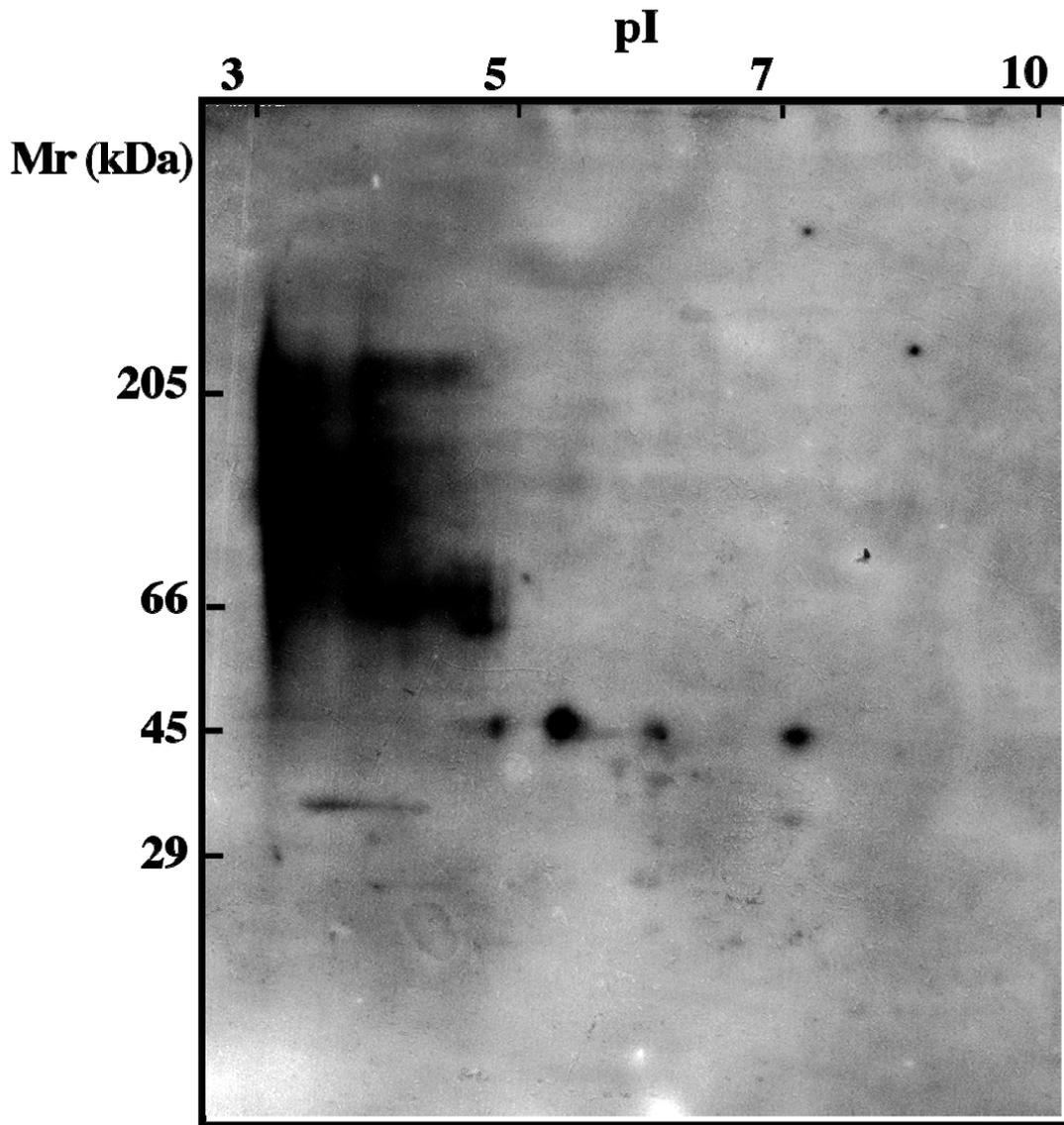


FIG. 14

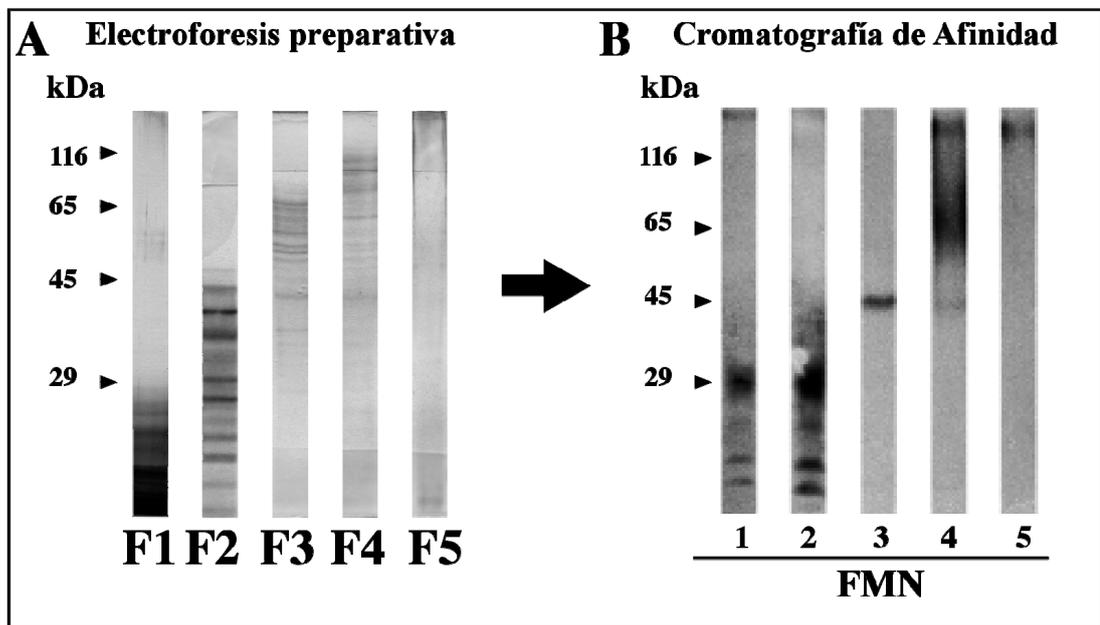


FIG. 15

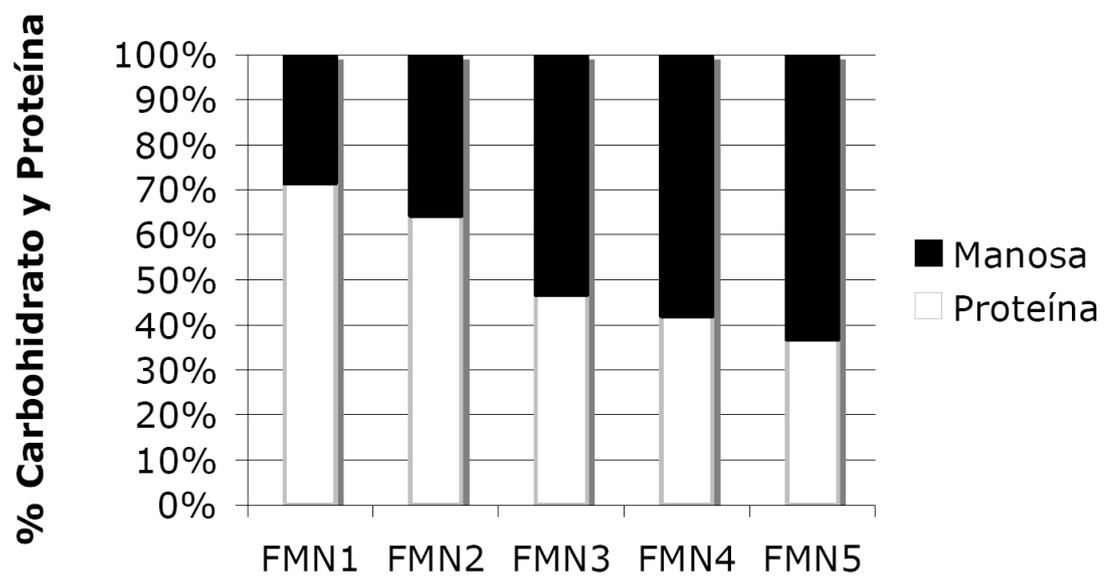


FIG. 16

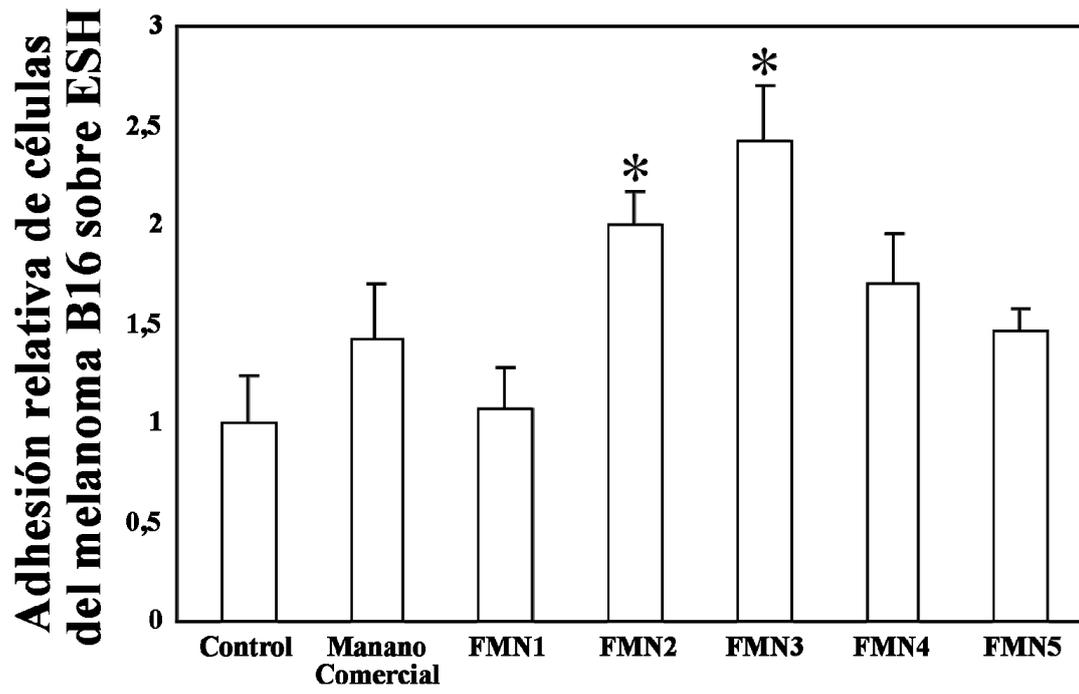


FIG. 17

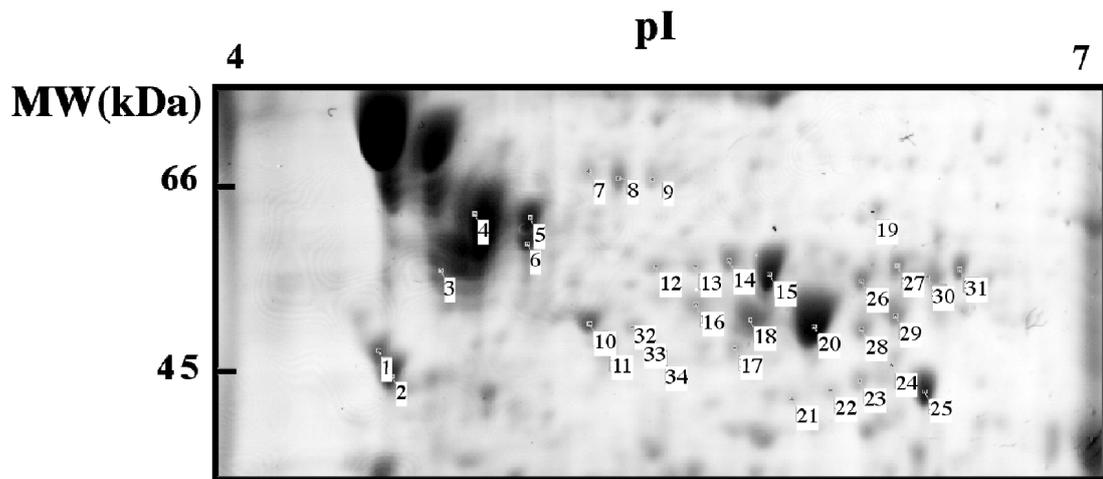


FIG. 18

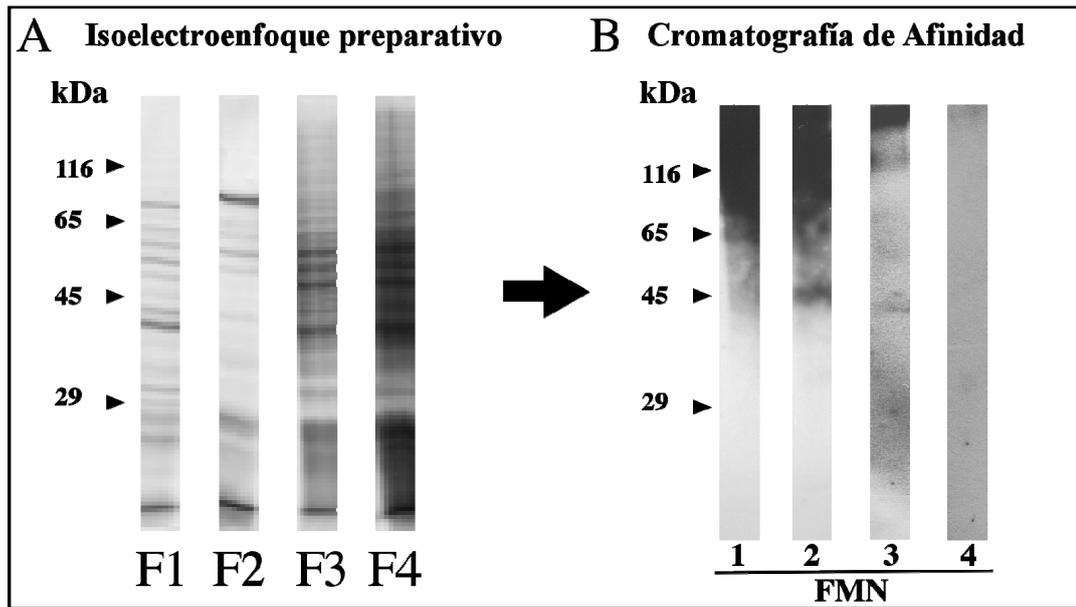


FIG. 19

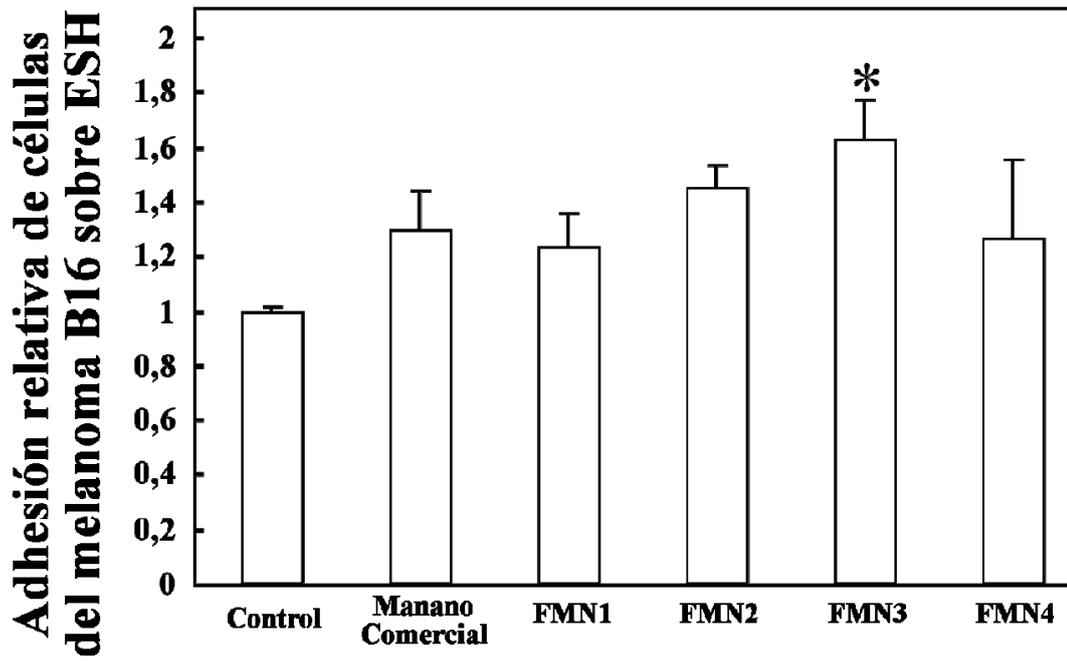


FIG. 20

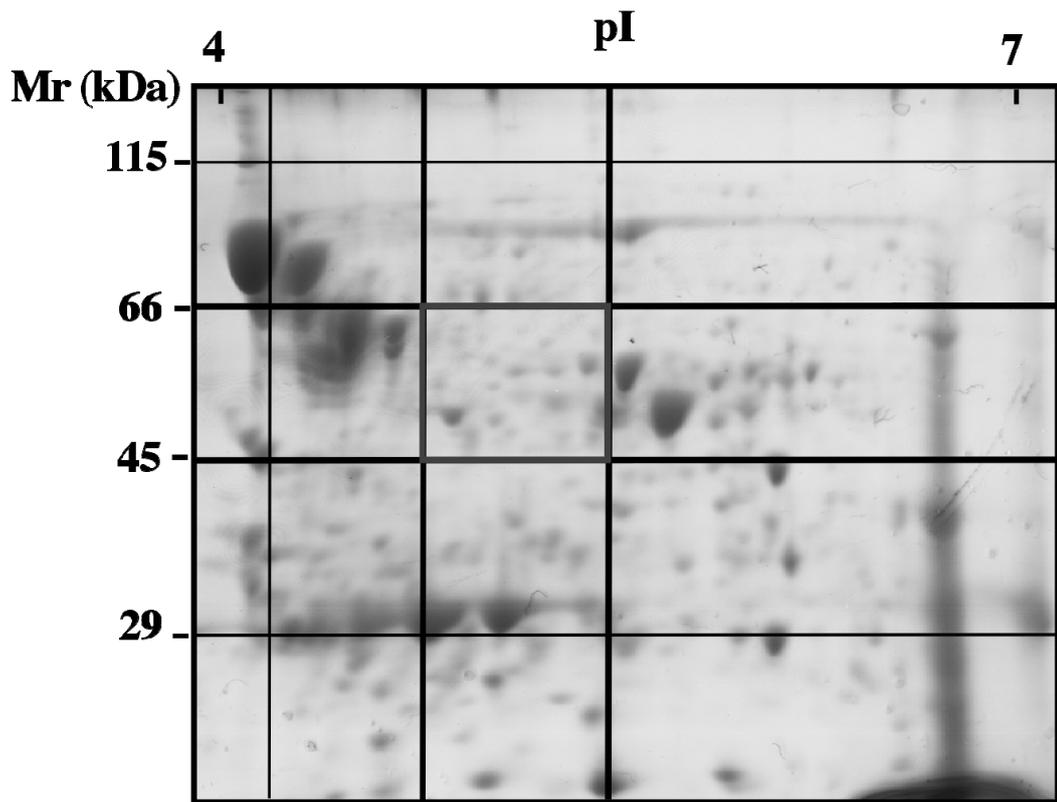


FIG. 21

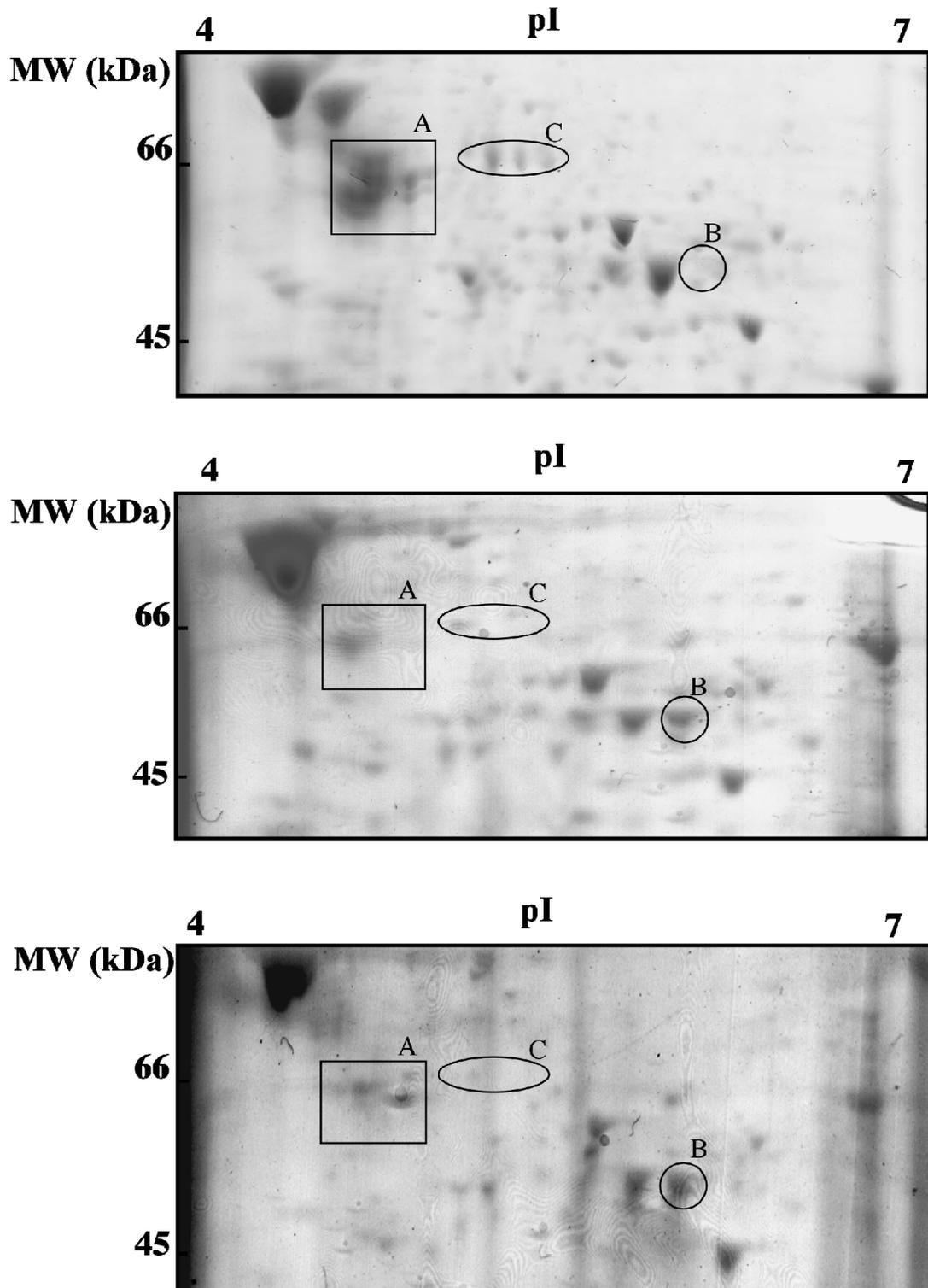


FIG. 22

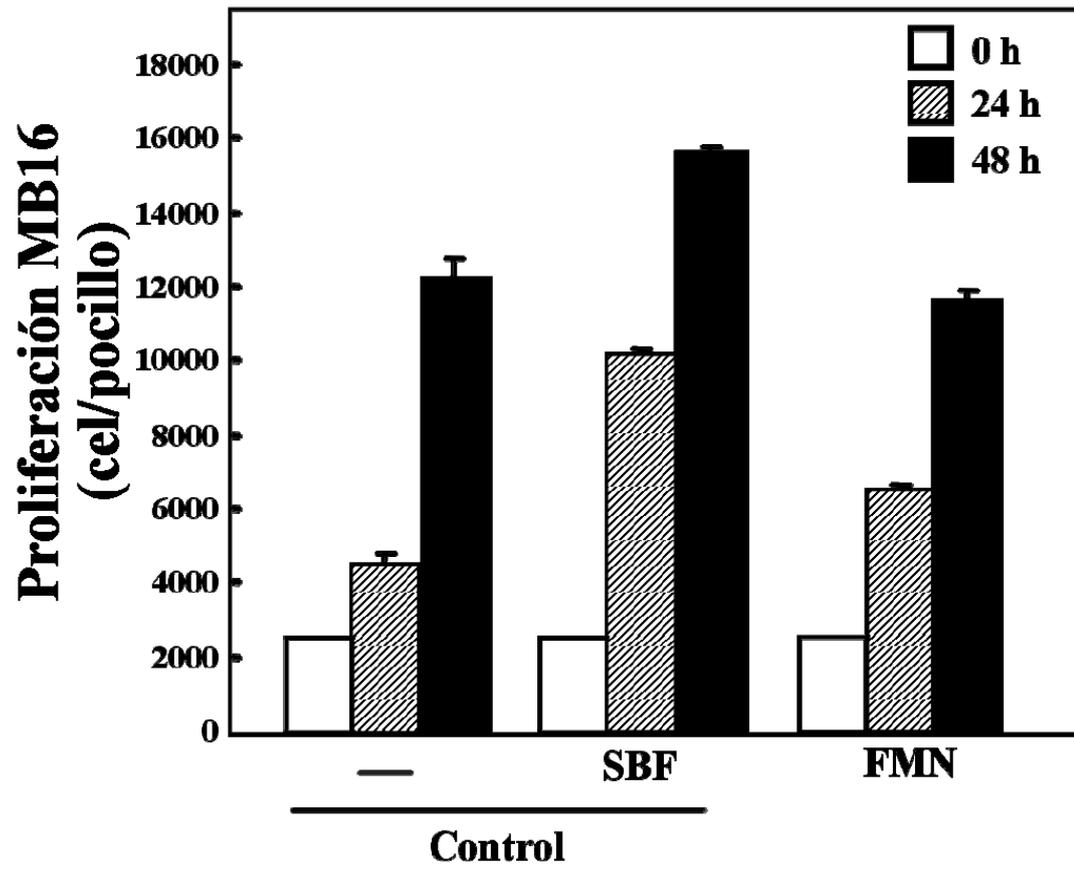


FIG. 23

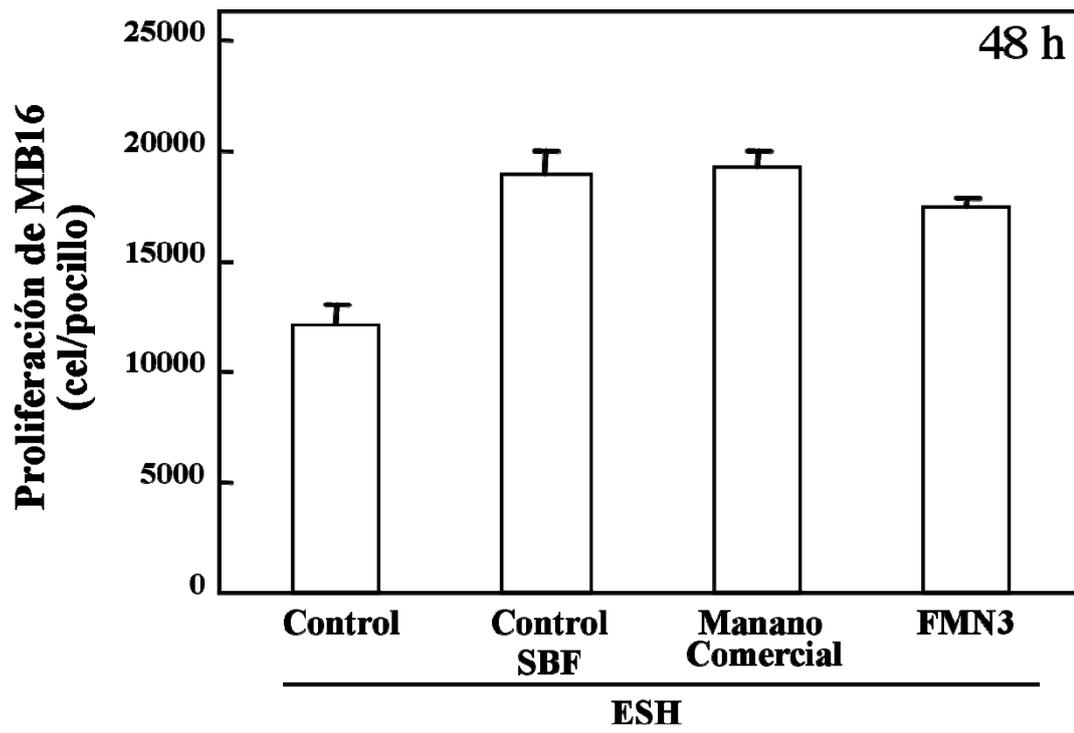


FIG. 24

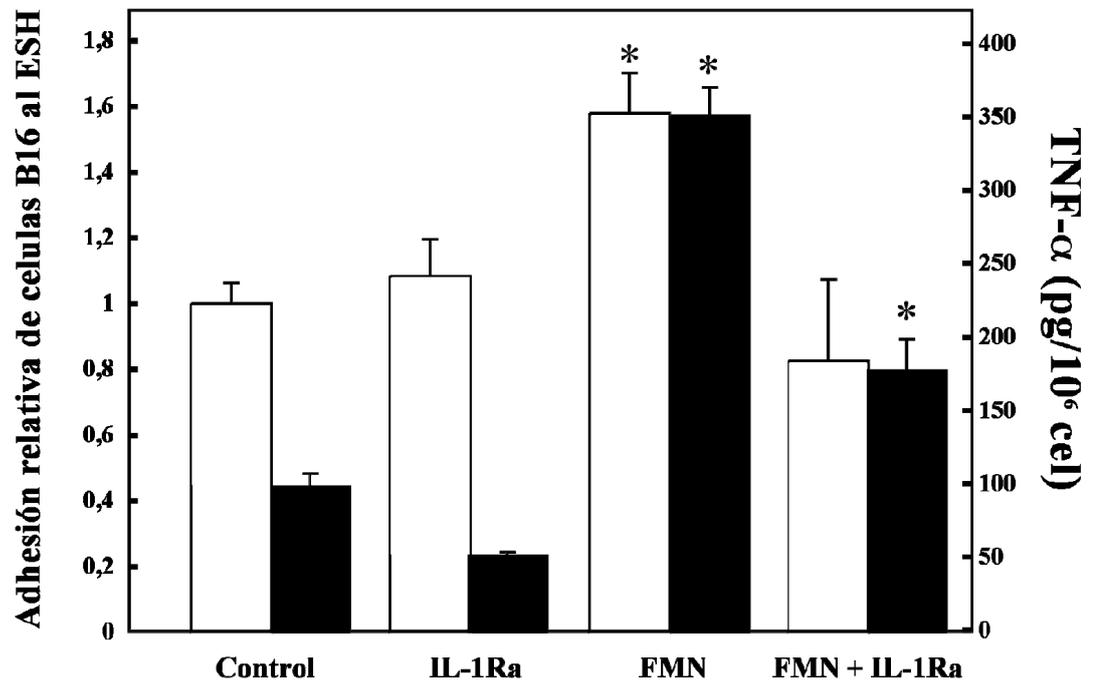


FIG. 25

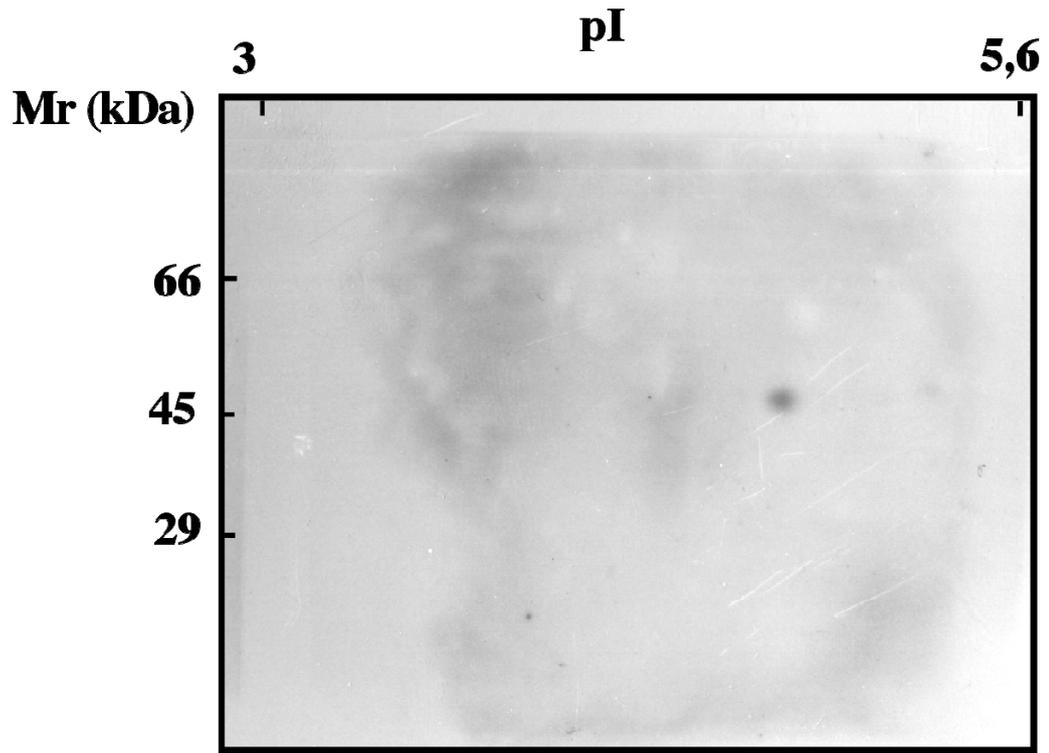


FIG. 26