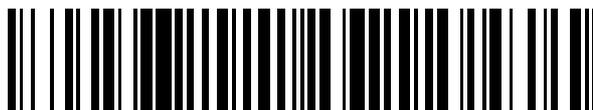


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 426**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2009 E 09765915 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2013 EP 2307043**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas de CD5 para el tratamiento de procesos infecciosos e inflamatorios de origen fúngico**

30 Prioridad:

20.06.2008 ES 200801860

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.11.2013

73 Titular/es:

**HOSPITAL CLINIC I PROVINCIAL DE
BARCELONA (33.3%)
C/ Villarroel 170
08036 Barcelona, ES;
FUNDACIO CLINIC PER A LA RECERCA
BIOMEDICA (33.3%) y
UNIVERSITAT DE BARCELONA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**LOZANO SOTO, FRANCISCO y
VERA FERNÁNDEZ, JORGE**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 429 426 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas de cd5 para el tratamiento de procesos infecciosos e inflamatorios de origen fúngico.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención pertenece al campo de las infecciones fúngicas. Se refiere específicamente a composiciones farmacéuticas que comprenden el ectodominio de CD5 soluble para la prevención y/o el tratamiento de infecciones fúngicas y/o septicemia fúngica, además de trastornos inflamatorios de origen fúngico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El reconocimiento de patógenos por el sistema inmunitario innato se basa en un número limitado de receptores codificado por la línea germinal fija que se han desarrollado para identificar estructuras microbianas conservadas tanto no compartidas por el huésped como esenciales para su supervivencia, los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (1, 2). Ejemplos de PAMP son lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas, ácido lipoteicoico (LTA) y peptidoglicano (PGN) de bacterias Gram-positivas, lipoarabinomano de micobacterias y β -glucanos y mananos de hongos. Existen varias clases estructuralmente y funcionalmente diversas de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que inducen diversas rutas de defensa del huésped. Los dominios de proteína implicados en el reconocimiento de patrones incluyen, entre otros, el dominio de lectina de tipo C de lectinas de células dendríticas (DC), la repetición rica en leucina (LRR) de receptores similares a Toll (TLR) y el rico en cisteína de receptores depuradores (SRCR) (2). El último se describió por primer vez tras la clonación del receptor depurador de macrófagos de clase A tipo I de ratón (SR-AI) (3). La comparación de secuencias con varias otras proteínas, tales como el receptor speract de erizo marino, CD5 humana y de ratón y factor I del complemento revelaron la existencia de un motivo conservado de 100 aminoácidos de longitud característico de una nueva superfamilia de receptores de proteína, llamada SRCR-SF. Esta familia está actualmente compuesta por más de 30 proteínas de la superficie celular y/o secretadas diferentes con representantes en la mayoría de los filos animales, de invertebrados inferiores a mamíferos (4). Los miembros de SRCR-SF se dividen en dos grupos: los miembros del grupo A contienen dominios SRCR compuestos por 6 cisteínas y codificados por dos exones, mientras que aquellos del grupo B contienen 8 cisteínas y están codificados por un único exón. Datos estructurales recientes indican, sin embargo, que tanto los dominios SRCR del grupo A como B comparten un andamiaje similar (un núcleo central formado por dos hojas β antiparalelas y una hélice α), siendo observadas las principales diferencias en los bucles de conexión (5). Esta situación recuerda la de otros módulos de proteína satisfactorios del sistema inmunitario de cuya evolución se ha establecido y construido una miríada de proteínas diferentes (por ejemplo, dominio de inmunoglobulina). La versatilidad de estos dominios conservados se basa en el hecho de que residuos clave que estabilizan la estructura del dominio se conservan mediante la evolución, mientras que otros pueden desarrollarse libremente (especialmente aquellos en los bucles externos), dando lugar a gran diversidad funcional (6). Por consiguiente, a pesar de su alto grado de conservación estructural y filogenética, no hay una función unificadora informada para los dominios de SRCR. Algunos de ellos participan en interacciones proteína-proteína, siendo los ejemplos más bien estudiados la interacción del receptor de linfocitos CD6 con CD166/ALCAM, una molécula transmembrana de adhesión que pertenece a la superfamilia de Ig (7, 8), y la del receptor de macrófagos CD163/M130 con el complejo de hemoglobina-haptoglobina (9). Algunos miembros de SRCR-SF de tanto el grupo A (es decir, SR-AI/II, MARCO y SCARA5) como B (es decir, DMBT1, Sp α y CD6) también son conocidos por interactuar con PAMP presentes sobre superficies bacterianas tales como LPS, LTA y PGN. Aunque estas interacciones se mapearon inicialmente fuera del dominio de SRCR (10), pruebas recientes demuestran la participación directa de dominios de SRCR en ellas (11-14). Por tanto, queda por analizar si la depuración de patógenos es o no una propiedad general compartida por todos los miembros de SRCR-SF o solo por un grupo seleccionado de sus miembros.

Los receptores de tipo I transmembrana CD5 y CD6 son dos miembros del grupo B linfocito de SRCR-SF. Ambos comparten importantes similitudes a nivel estructural y funcional y están codificados por genes contiguos en la misma región del cromosoma que se cree que se derivan de la duplicación de un gen ancestral común (15, 16). CD5 y CD6 se expresan en timocitos de fases tempranas de su desarrollo, sobre linfocitos T periféricos maduros y en células B1a, un pequeño subconjunto de linfocitos B maduros responsables de la producción de anticuerpos naturales polirreactivos y que se expande en ciertas enfermedades autoinmunitarias y en leucemias linfocíticas crónicas de linfocitos B (17). Las regiones extracelulares de tanto CD5 como CD6 están compuestas exclusivamente de tres dominios de SRCR del grupo B consecutivos, que muestran la amplia identidad de secuencias de aminoácidos (5). Las principales diferencias entre CD5 y CD6 se encuentran en sus grandes regiones citoplásmicas, ambas de las cuales carecen de actividad catalítica intrínseca, pero contienen varios motivos estructurales compatibles con una función en la transducción de señales (18, 19). A ese aspecto, CD5 y CD6 están físicamente asociados al complejo específico para antígeno presente en linfocitos T (TCR) y B (BCR) (20, 21) y se co-localizan con él en el centro de la sinapsis inmunológica (21, 22). Por tanto, CD5 y CD6 están bien posicionados para modular tanto positivamente como negativamente la activación y diferenciación de señales generadas por el receptor específico para antígeno (22-26) por rutas de señalización todavía incompletamente entendidas y complejas (23, 27-29). Esto se alcanza probablemente mediante el engranaje de los ectodominios de CD5 y CD6 por diferentes contra-receptores de la superficie celular. Aunque está bien establecido que CD6 se une a CD166/ALCAM (30), todavía hace falta un ligando de CD5 fiable (31-35). De forma interesante, CD5 y CD6 parecen diferenciarse en los residuos críticos para unirse a CD166/ALCAM (36).

60 Axtell y col., J. Immunol. (2004) 173: 2928 - 2932, investigan la función de CD5 en encefalomiелitis autoinmune

experimental (EAE) en ratones y muestran que puede promoverse la recuperación de EAE usando CD5-Fc murino soluble.

5 En un estudio previo se exploraron las capacidades de unión bacterianas de los ectodominios de CD5 y CD6, ambos conocidos por también existir como formas solubles que circulan en suero (37, 38). Los datos informados indicaron que tanto las formas solubles como de membrana de CD6, pero no de CD5, se unen a la superficie de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas mediante el reconocimiento de PAMP específicos (concretamente LPS y LTA, respectivamente) (39).

10 Otros estudios han mostrado que aquellas células, tanto linfocitos T como linfocitos B, que expresan receptor de CD5 en la superficie tienen la capacidad de reconocer y afectar, a un mayor o menor grado, el desarrollo normal de *C. neoformans* y *C. albicans* (48, 49).

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

15 Ahora, los autores de la presente invención han extendido esos estudios al análisis del reconocimiento y propiedades de unión de CD5 y CD6 a estructuras fúngicas y han mostrado que, en comparación con CD6, el ectodominio de CD5 es muy apto para el reconocimiento de componentes conservados sobre superficies celulares fúngicas, que muestra por primera vez que dicha región extracelular aislada del receptor de CD5 puede proporcionar por sí misma profilaxis *in vivo* contra una infección fúngica general, no solo contra *C. neoformans* y *C. albicans*.

20 Los autores han mostrado que las células fúngicas son específicamente reconocidas, unidas y agregadas por formas solubles del ectodominio de CD5. Esto se hace mediante el reconocimiento de β -glucanos, un componente estructural conservado de paredes celulares fúngicas, por el ectodominio de CD5 soluble.

Además, los autores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que los ectodominios de CD5 solubles tiene un efecto protector en el modelo de ratón de síndrome similar a choque séptico inducido por zymosan.

Estos resultados respaldan la utilidad terapéutica de la infusión de ectodominio de CD5 humana soluble para el tratamiento de síndrome de choque séptico u otros procesos inflamatorios de origen fúngico.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

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

Figura 2. Inducción de agregación de células fúngicas por rshCD5.

35 Suspensiones de células de *C. albicans* marcadas con FITC con albúmina de suero bovino (BSA), rshCD5 y rshCD6 tanto solas (panel superior e intermedio) como en presencia de cantidades en exceso de zymosan o β -glucano o manano (panel inferior).

Figura 3: Unión de rshCD5 a zymosan pero no a constituyentes de la pared celular bacteriana.

(A) Placas de ELISA recubiertas con BSA, zymosan (ZYM), LPS, PGN o LTA se incubaron con cantidades crecientes de rshCD5 marcada con biotina. (B) Placas de ELISA recubiertas con BSA, ZYM, LPS, PGN o LTA se incubaron con rshCD6.

40 Figura 4. La unión de rshCD5 a tanto zymosan como a células fúngicas completas es competida por β -glucanos.

(A) La unión de rshCD5 y rshCD6 marcadas con biotina a placas de ELISA recubiertas con zymosan compitió en presencia de cantidades crecientes de β -D-glucanos, zymosan, manano o BSA. (B) La unión de rshCD5 marcada con biotina a suspensiones de células de *C. albicans* o *C. neoformans* compitió en presencia de cantidades crecientes de zymosan, β -D-glucano, glucano, β -1,3-glucano o manano.

45 Figura 5: Zymosan marcado con FITC se une a CD5 de membrana.

50 (A) Cantidades crecientes de zymosan marcado con FITC se incubaron con células Jurkat 2G5 deficientes en CD5 y CD6 tanto sin transfectar (histograma superior) como transfectadas (histograma inferior) para expresar el receptor de CD5 de membrana natural (2G5-CD5.WT) (B) Transfectantes 2G5 de Jurkat que expresan el receptor de CD5 de membrana natural (2G5-CD5.WT) se tiñeron con zymosan marcado con FITC en presencia de cantidades elevadas de zymosan (arriba), β -D-glucano (intermedio) y manano (abajo).

Figura 6. Zymosan induce la activación de la cascada de MAPK mediada por CD5 y la liberación de citocinas.

5 (A) Células Jurkat 2G5 que expresan formas naturales (2G5-CD5.WT) o truncadas en la cola citoplásmica (2G5-CD5-K384^{STOP}) de CD5 se pulsaron con zymosan y se analizaron por transferencia Western con antisuero de conejo policlonal anti-ERK1/2 fosforilado (pERK1/2), de ratón monoclonal anti-MEK fosforilado (pMEK) y de conejo policlonal anti-cdk4 como control de carga. (B) Liberación de IL-8 inducida por zymosan de células HEK 293 o células HEK 293-TLR2 que expresan transitoriamente formas CD5 de la membrana natural (CD5.WT) o truncadas en la cola citoplásmica (CD5.K384^{STOP}). (C) Análisis de transferencia Western de la expresión de CD5 en muestras de células del experimento mostrado en (B).

10 Figura 7. El pre-tratamiento con rshCD5 protege de síndrome similar a choque séptico inducido por zymosan en ratones.

15 (A) La puntuación de toxicidad de ratones CD1 se distribuyó en los grupos: BSA, ratones infundidos con BSA (25 µg; i.p.) sola; BSA + ZYM, ratones pre-tratados con BSA (25 µg; i.p.) antes de la infusión con zymosan (500 mg/kg; i.p.); rshCD5 + ZYM, ratones pre-tratados con rshCD5 (25 µg; i.p.) antes de la infusión con zymosan (500 mg/kg; i.p.). (B) Recuento de leucocitos total en exudados peritoneales 18 h después de la administración de zymosan de animales del mismo grupo que en A. N=20 para cada uno grupo. (C) Niveles en suero de IL-6 (izquierda) y IL-1β (derecha) 18 h después de la administración de zymosan de los animales del mismo grupo que en A. N=15 para cada grupo. (D) Actividad de mieloperoxidasa (MPO) (mU/mg de tejido húmedo) 18 h después de la administración de zymosan en el hígado de animales del mismo grupo que en A. N=3 para cada grupo. (E) Curvas de supervivencia de ratones de los mismos grupos que en A. N=25 por grupo.

20 OBJETIVO DE LA INVENCION

Es un objeto de la invención una composición farmacéutica que comprenda el ectodominio soluble del receptor de linfocitos de CD5 y al menos un excipiente farmacéutico para su uso en un procedimiento de prevención y/o tratamiento de infección fúngica y/o septicemia fúngica y/o cualquier trastorno inflamatorio desencadenado por componentes fúngicos.

25 También se describe el uso del ectodominio de CD5 soluble para la unión y/o reconocimiento de β-glucano fúngico.

También se describe el uso del ectodominio de CD5 soluble para agregar células fúngicas y/o componentes de la pared celular fúngica ricos en β-glucano.

30 Finalmente, también es un objetivo de la invención el uso del ectodominio de CD5 soluble para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de infección fúngica y/o septicemia fúngica y/o cualquier trastorno inflamatorio relacionado con ella.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han mostrado que el ectodominio de CD5 soluble se une a y agrega células fúngicas mediante el reconocimiento de componentes conservados sobre superficies celulares fúngicas, concretamente β-glucanos.

35 Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende formas solubles de tanto el ectodominio de CD5 completo como partes del mismo y al menos un excipiente farmacéutico tal como glicerol, sacarosa, etc., para su uso en un procedimiento de prevención y/o tratamiento de infección fúngica y/o septicemia fúngica y/o cualquier trastorno inflamatorio desencadenado por componentes fúngicos.

40 Un ectodominio es la parte de una proteína de membrana que se extiende en el espacio extracelular (el espacio fuera de una célula). La región extracelular de CD5 está compuesta por tres dominios SRCR del grupo B consecutivos (CD5.DI, CD5.DII y CD5.DIII). Los tres ectodominios SRCR individuales de CD5 retuvieron la capacidad de interactuar con superficies celulares fúngicas. Por tanto, en el contexto de la presente invención, el "ectodominio de CD5 soluble" se considera que es tanto de dominios CD5.DI, CD5.DII y CD5.DIII como combinaciones que incluyen cualquiera de ellos.

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

50 La infusión del ectodominio de CD5 soluble es beneficiosa para la prevención y/o tratamiento de infección fúngica y/o septicemia de origen fúngico. Además, el ectodominio de CD5 soluble también es útil para la prevención y/o tratamiento de procesos inflamatorios desencadenados por componentes fúngicos, aún cuando no tenga lugar una infección clínica activa (o septicemia). Los componentes de la pared fúngica desencadenan reacciones inflamatorias, independientemente de si progresa o no la infección clínica, y, en esos casos, el ectodominio de CD5 soluble también puede ser eficaz debido a que actúa previniendo sus efectos inflamatorios.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a la composición farmacéutica del ectodominio de CD5 soluble para la prevención y/o tratamiento de infección fúngica y/o septicemia y/o cualquier trastorno inflamatorio relacionado con ella, tal como SIRS o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; serositis aséptica, etc.

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

También se describe el uso del ectodominio de CD5 soluble para la unión y/o reconocimiento de β -glucanos.

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

También se describe el uso del ectodominio de CD5 soluble para agregar células fúngicas y/o componentes de la pared celular fúngica rica en β -glucano de varias especies fúngicas (tanto saprofitas como patógenas).

10 El hecho de que el ectodominio de CD5 soluble no solo se una, sino que también agregue, a células fúngicas es de relevancia ya que la agregación es una estrategia común usada por componentes del sistema inmunitario innato para dificultar la diseminación de patógenos y para facilitar la eliminación de patógenos por fagocitos.

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

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

Previamente se ha descrito la generación de ectodominios DIII de CD5 humana solubles recombinantes (rshCD5.DIII) (5).

20 Ahora, los autores de la presente invención han desarrollado nuevos cebadores para la generación de construcciones de expresión para los ectodominios DI y DII de CD5 humana solubles recombinantes (rshCD5.DI y rshCD5.DII). Los oligonucleótidos para la amplificación del ectodominio DI de rshCD5 son SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2, y los oligonucleótidos para la amplificación de DII de rshCD5 son SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.

25 Por tanto, otro aspecto descrito aquí se refiere a un procedimiento para obtener un ectodominio DI de CD5 humana soluble recombinante (rshCD5.DI), que comprende:

a) Amplificación por PCR del ectodominio DI usando los cebadores de secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2,

b) Clonación del fragmento amplificado en un vector de expresión, y

c) Expresión y purificación del ectodominio DI de CD5 recombinante humana soluble.

30 El fragmento amplificado puede clonarse en el vector pCEP-Pu apropiadamente digerido (Kohfeldt y col., 1997).

La expresión del ectodominio DI de CD5 recombinante humana soluble puede hacerse en células HEK 293-EBNA.

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

35 a) Amplificación por PCR del ectodominio DII usando los cebadores de secuencias SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.

b) Clonación del fragmento amplificado en un vector de expresión, y

c) Expresión y purificación del ectodominio DII de CD5 recombinante.

El fragmento amplificado puede clonarse en el vector pCEP-Pu apropiadamente digerido.

40 En otra realización preferida, la expresión del ectodominio DII de CD5 recombinante humana soluble es en células HEK 293-EBNA.

Los siguientes ejemplos a modo de ilustración y no limitación definen adicionalmente la presente invención:

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Los ectodominios SRCR de CD5 humana se unen a suspensiones de células fúngicas completas

45 En un esfuerzo por extender adicionalmente los estudios de las propiedades de unión microbianas de los ectodominios de receptores de linfocitos de CD5 y CD6 humanas (39), los autores de la presente invención realizaron ensayos de

unión de proteínas directos a hongos. Para esto, una cantidad fija (15 μg) de preparaciones marcadas con biotina de proteínas solubles recombinantes purificadas por afinidad que engloban los tres ectodominios SRCR de CD5 humana (rshCD5) o CD6 humana (rshCD6) se incubaron con 10^8 células de *S. pombe*, *C. albicans* o *C. neoformans* durante la noche a 4 °C. Previamente se ha mostrado que estas proteínas rshCD5 y rshCD6 son indistinguibles (en masa molecular aparente, reactividad del anticuerpo y propiedades de unión a célula) de formas en circulación equivalentes presentes en suero humano normal (33, 39). Después de amplios lavados, la unión de proteína se solubilizó con tampón de muestra Laemmli y se ejecutó sobre geles de SDS/PAGE y posterior transferencia Western contra estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP-SAv) y posterior revelado por quimioluminiscencia. Los resultados mostraron que rshCD5 se une a las especies de células fúngicas saprofiticas (*S. pombe*) y patógenas (*C. albicans*, *C. neoformans*) probadas, mientras que rshCD6 se une solo a las saprofiticas (Fig. 1A). La unión de diferentes cantidades (de 1 a 20 μg) de rshCD5 marcada con biotina a *C. albicans* se analizó como en la Fig. 1A. También se muestra la unión de 20 μg de rshCD5 marcada con biotina en presencia de EDTA 5 mM. La unión de rshCD5 se mostró que era dependiente de la dosis y saturable, y se facilitó enormemente por Ca^{2+} , ya que la unión reducida se observó tras la adición de EDTA (Fig. 1 B). Cuando las mismas preparaciones de proteína se probaron para la unión a 10^8 bacterias Gram-negativas (*E. coli*) o Gram-positivas (*S. aureus*), se observó tanto poca como ninguna unión a rshCD5 (Fig. 1 C) según datos previamente informados (39). Esto indica que, a diferencia de CD6, la región extracelular de CD5 es muy apta para el reconocimiento de estructuras de paredes celulares fúngicas, pero no bacterianas.

Con el fin de identificar cuál de los tres dominios de SRCR (CD5.DI, CD5.DII y CD5.DIII) de la región extracelular de CD5 participó en la unión fúngica de otros ensayos de unión de células fúngicas completas, sobrenadantes de cultivo celular de transfectantes de HEK 293-EBNA que expresan dominios de SRCR solubles individuales de rshCD5 se incubaron con 10^8 *C. albicans* o *C. neoformans* durante la noche a 4 °C. La proteína sin unir (SU) se eliminó por lavado y precipitó con 10% de ácido tricloroacético (TCA). Las proteínas precipitables por TCA y unidas a célula (**B**) se sometieron a electroforesis en geles de SDS-PAGE y se analizaron por transferencia Western con un antisuero policlonal de conejo anti-CD5 más antisuero anti-conejo de oveja marcado con HRP, y posterior revelado por quimioluminiscencia. Como se ilustra por la Fig. 1D, los tres ectodominios SRCR individuales de CD5 retuvieron la capacidad para interactuar con superficies celulares fúngicas. Esto indica que un motivo estructural conservado compartido por los tres ectodominios SRCR de CD5 es responsable de la depuración fúngica.

Ejemplo 2: Inducción de la agregación de células fúngicas por el ectodominio de CD5 soluble

Con el fin de investigar si la existencia de múltiples sitios de unión sobre el ectodominio de CD5 humana conduciría o no a agregación fúngica, suspensiones de células de *C. albicans* marcadas con FITC se incubaron durante la noche a 4 °C con 5 ó 10 μg de proteínas sin marcar solubles (BSA, rshCD5 y rshCD6) y luego se analizaron por microscopía de epifluorescencia. Bajo estas condiciones, rshCD5 indujo la agregación de células fúngicas dependiente de la dosis, mientras que ni rshCD6 ni BSA pudieron inducir un fenómeno tal (Fig. 2, panel superior e intermedio). Los mismos resultados también se observaron cuando se ensayaron células fúngicas de *C. neoformans*. De forma interesante, la agregación de células fúngicas inducida por rshCD5 se redujo significativamente cuando los ensayos se realizaron en presencia de cantidades en exceso (20 μg) de zymosan (de *S. cerevisiae*) o β -glucano (de cebada), pero no de manano (de *S. cerevisiae*) (Fig. 2, panel inferior). Esto mostró que la unión a y agregación de células fúngicas por rshCD5 es específica y es probable que esté mediada por el reconocimiento de componentes específicos de la pared celular fúngica tales como β -glucanos.

Ejemplo 3: Unión directa del ectodominio de CD5 soluble a componentes conservados de paredes celulares fúngicas, pero no bacterianas

Para confirmar y caracterizar adicionalmente las capacidades de unión fúngicas del ectodominio de CD5 humana soluble se evaluó su unión directa a preparaciones de paredes celulares fúngicas purificadas. Para esto, placas de ELISA de 96 pocillos recubiertas con BSA, zymosan, LPS, PGN o LTA se incubaron con cantidades crecientes (de 0,01 a 2 μg) de rshCD5 marcada con biotina. La proteína unida se detectó mediante la adición de HRP-SAv y posterior revelado con sustrato líquido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. La absorbancia se leyó a 450 nm. Según los experimentos de unión a células fúngicas y bacterianas representados en la Fig. 1, rshCD5 marcada con biotina se unió a placas recubiertas con zymosan (*S. cerevisiae*) en un modo dependiente de la dosis (Fig. 3A, superior), pero no a placas recubiertas con LPS, LTA o PGN (Fig. 3A, inferior). En ensayos paralelos, rshCD6 marcada con biotina se unió a placas recubiertas con LPS, LTA o PGN de un modo dependiente de la dosis (Fig. 3B, inferior), como era de esperar (39). Se observó dependencia de la dosis similar para rshCD6 a placas recubiertas con zymosan, aunque los valores de absorbancia fueron siempre inferiores a los obtenidos para rshCD5 (Fig. 3B y 3A, superior). Esto refuerza la declaración anteriormente mencionada sobre la idoneidad del ectodominio de CD5 humana para depurar constituyentes de la pared celular fúngica, pero no bacteriana, en comparación con el ectodominio de CD6 humana.

Se realizaron otros ensayos de ELISA de competencia para determinar la especificidad del componente de la pared celular fúngica responsable de la interacción con el ectodominio de CD5 humana. Para esto, una cantidad fija (2 μg) de rshCD5 y rshCD6 marcadas con biotina se incubó con placas de ELISA recubiertas con zymosan en presencia o ausencia de cantidades crecientes (de 0,01 a 20 μg) de competidores sin marcar (β -D-glucano, zymosan, manano o BSA). La proteína unida se detectó mediante la adición de HRP-SAv y posterior revelado con sustrato líquido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. La absorbancia se leyó a 450 nm. Según los resultados de agregación fúngica mostrados

en la Fig. 2 izquierda, β -D-glucano y zymosan, pero no manano, pudieron competir con la unión de rshCD5 marcada con biotina a zymosan de un modo dependiente de la dosis (Fig. 4A, izquierda). Por el contrario, cuando se realizaron los mismos ensayos con rshCD6 marcada con biotina, solo zymosan pudo competir por la unión (Fig. 4A, derecha).

5 A continuación se analizó la capacidad de diferentes preparaciones que contienen β -glucano para competir por la unión del ectodominio de CD5 humana a estructuras de la pared celular fúngica. Para esto, la unión de una cantidad fija de rshCD5 marcada con biotina (15 μ g) a células fúngicas completas compitió con concentraciones crecientes de β -glucano purificado de cebada, β -1,3-glucano purificado de *Euglena gracilis* y glucano de *S. cerevisiae*, además de con zymosan o manano (ambos de *S. cerevisiae*) usados como controles positivos y negativos, respectivamente. Después de amplios lavados, la proteína unida se solubilizó y se ejecutó sobre SDS-PAGE. La detección de rshCD5 marcada con biotina se
10 realizó por transferencia Western usando HRP-SAv y posterior revelado por quimioluminiscencia. Como se ilustra por la Fig. 4B, todas las preparaciones de glucano usadas compitieron por la unión de rshCD5 marcada con biotina a tanto suspensiones de células de *C. albicans* como de *C. neoformans* de un modo dependiente de la dosis. Estos resultados mostraron que la interacción del ectodominio de CD5 humana con hongos está probablemente mediada por el β -1,3-glucano de reconocimiento, un constituyente altamente conservado y abundante de paredes celulares fúngicas.

15 **Ejemplo 4: Zymosan se une a CD5 unida a membrana e induce activación mediada por CD5 de la cascada de MAPK**

Los autores cuestionaron a continuación si la forma unida a membrana del receptor de CD5 humana también podía o no interactuar con constituyentes de la pared celular fúngica. Para esto, se investigó la unión de cantidades crecientes de zymosan marcado con FITC tanto a células 2G5 sin transfectar como transfectadas con CD5, un derivado de células de Jurkat seleccionado para la deficiente expresión de tanto receptores de CD5 como de CD6 (40). Se incubaron
20 cantidades crecientes (de 1 a 30 μ g) de zymosan marcado con FITC con células Jurkat 2G5 tanto sin transfectar como transfectadas para expresar el receptor de CD5 membrana natural (2G5-CD5.WT). La intensidad de fluorescencia de células teñidas se analizó por citometría de flujo. Como se muestra en la Fig. 5A, la intensidad de fluorescencia de células 2G5 que expresan establemente la forma unida a membrana natural de CD5 (2G5-CD5.WT) fue mayor en comparación con las células 2G5 sin transfectar. La posterior confirmación de los resultados se obtuvo de experimentos de unión por competencia en transfectantes estables 2G5-CD5.WT, en los que una cantidad fija de zymosan marcado con FITC (15 μ g) compitió con concentraciones crecientes (de 1 a 30 μ g) de zymosan sin marcar (*S. cerevisiae*), β -D-glucano (cebada) y manano (*S. cerevisiae*). La intensidad de fluorescencia de células teñidas se analizó por citometría
25 de flujo. Como se muestra en la Fig. 5B, tanto β -glucano como zymosan, pero no manano, pudieron competir por la unión de zymosan marcado con FITC de un modo dependiente de la dosis. Estos resultados son confirmatorios de aquellos obtenidos para rshCD5 y muestran que células que expresan CD5 podrían detectar la presencia de constituyentes de la pared celular fúngica conservados.

Otras pruebas de la unión de zymosan a la forma unida a la membrana de CD5 se obtuvieron de la activación de miembros de la cascada de señalización de MAPK en transfectantes 2G5 estables que expresan tanto formas de CD5 naturales (2G5-CD5.WT) como truncadas en la cola citoplásmica (2G5-CD5.K384^{stop}) (41). Para esto, 2×10^6 células 2G5 tanto sin transfectar como transfectadas se pulsaron durante tiempos diferentes (de 0 a 30 min) con 40 μ g/ml de zymosan a 37 °C. Posteriormente, las muestras de lisado celular se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE y se analizaron por transferencia Western con antisuero de conejo policlonal anti-ERK1/2 fosforilado (pERK1/2), de ratón monoclonal anti-MEK fosforilado (pMEK) y de conejo policlonal anti-cdk4, el último usado como control de carga.
35 Después de amplios lavados, la membrana se reveló por quimioluminiscencia con antisueros de oveja dirigidos contra Ig de conejo o ratón marcada con HRP, respectivamente. Como se muestra en la Fig. 6A, la exposición a zymosan indujo una fosforilación dependiente del tiempo de tanto MEK como ERK1/2 en células 2G5-CD5.WT, pero no en las células 2G5 sin transfectar parentales. De forma interesante, la fosforilación inducida por zymosan de tanto MEK como ERK1/2 no se observó en transfectantes 2G5-CD5.K384^{stop} (Fig. 6A, derecha), que expresan una forma de CD5 truncada en la cola citoplásmica carente de la mayoría de los 88 aminoácidos del extremo C (41). Esto indica que la activación de la cascada de MAPK por zymosan en células 2G5 depende de la expresión de CD5, además de la integridad de su dominio citoplásmico.

45 **Ejemplo 5: Zymosan induce la liberación de citocinas mediada por CD5**

En un intento por explorar adicionalmente las consecuencias biológicas de la unión de constituyentes de la pared celular fúngica a CD5 unida a membrana, los autores decidieron analizar posteriores fenómenos de liberación de citocinas. Desafortunadamente, la estimulación de células 2G5 tanto parentales como establemente transfectadas no produjo liberación de citocinas significativa en diferentes momentos de tiempo. Esta insensibilidad se observó no solo tras la exposición a altas concentraciones de zymosan, sino también a potentes estímulos específicos para linfocitos T tal como combinaciones de mAb anti-CD3 y anti-CD28, indicando así la probable existencia de un bloqueo de la liberación
50 de citocinas en células 2G5.

En vista de estas observaciones, la forma unida a membrana de CD5 se expresó en un sistema de células de mamífero no linfoides, las células 293 de riñón embrionario humano (HEK). Tanto las células HEK 293 parentales como un transfectante de células HEK 293 que expresa establemente TLR2, un receptor muy conocido para zymosan, se transfectaron transitoriamente para la expresión de las formas naturales (CD5.WT) y truncadas en la cola citoplásmica

(CDS.K384^{stop}) de CD5 humana. Entonces, las células se sometieron a exposición a zymosan (20 µg/ml) durante 24 h y la concentración de IL-8 se midió en sobrenadantes de cultivo celular (100 µl) por ELISA. Como se muestra en la Fig. 6B, se observó significativa liberación de IL-8 para células HEK 293 que expresan CD5.WT en comparación con tanto células sin transfectar como células que expresan la molécula de CD5.K384^{stop} truncada. De forma interesante, los niveles de IL-8 detectados para células HEK 293 que expresan CD5.WT fueron similares a aquellos observados para transfectantes que expresan TLR2, usados como control positivo. Además, la co-expresión de CD5.WT y TLR2 no produjo ni efectos aditivos ni sinérgicos tras la exposición a zymosan. Tomados conjuntamente, estos resultados indican que la forma unida a la membrana de CD5 puede detectar la presencia de constituyentes de la pared celular fúngica y esto inicia una cascada de señalización independiente que produce la liberación de citocinas.

10 Ejemplo 6: La infusión del ectodominio de CD5 soluble protege de síndrome similar al choque séptico inducido por zymosan en ratones

La posterior validación *in vivo* de la unión del ectodominio de CD5 a constituyentes de la pared celular fúngica se obtuvo a partir del modelo de ratón de síndrome similar a choque séptico inducido por zymosan (42). Se evaluó si rshCD5 evitaría o no la inflamación sistémica y el fallo multiorgánico inducido tras la administración i.p. de una única dosis alta de zymosan (500 mg/kg). Bajo estas condiciones, zymosan produce tanto peritonitis aguda como lesión a órganos en el plazo de 18 h, además de elevada mortalidad de ratones durante un periodo de 12 días. Para este fin, ratones CD1 se asignaron a los siguientes grupos: BSA, ratones infundidos con BSA (25 µg; i.p.) sola; BSA + ZYM, ratones pre-tratados con BSA (25 µg; i.p.) antes de la infusión con zymosan (500 mg/kg; i.p.); rshCD5 + ZYM, ratones pre-tratados con rshCD5 (25 µg; i.p.) antes de la infusión con zymosan (500 mg/kg; i.p.). Como se muestra en la Fig. 7 A-E, la administración de una única dosis i.p. de 25 µg de rshCD5 en ratones 1 h antes de la exposición a zymosan indujo reducción significativa de la puntuación de toxicidad (Fig. 7A), recuento de leucocitos total en la cavidad peritoneal (Fig. 7B), niveles en plasma sanguíneo de IL-6 y IL-1β (Fig. 7C) e infiltración de neutrófilos del hígado como se mide por la actividad de mieloperoxidasa (MPO) (Fig. 7D) a 18 h. En otro conjunto de experimentos, la supervivencia de ratones se monitorizó y se observó un aumento significativo (45% frente al 15%) al final del periodo de observación (12 días) para animales que recibieron una única dosis i.p. de rshCD5 antes de la exposición a zymosan en comparación con controles (Fig. 7E). Tomados conjuntamente, estos resultados indican que el pre-tratamiento de ratones con rshCD5 previene la perjudicial inflamación sistémica inducida por zymosan y desvela el potencial terapéutico de rshCD5 para choque séptico fúngico.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

30 **Construcciones.** La generación de construcciones de expresión para las proteínas solubles rshCD5 (43), rshCD5.DIII (5) y rshCD6 (22) se ha descrito en cualquier parte. Los ectodominios DI y DII de rshCD5 se amplificaron por PCR usando los siguientes cebadores: DI directo (SEQ ID NO 1) e inverso (SEQ ID NO 2). DII directo (SEQ ID NO 3) e inverso (SEQ ID NO 4). La PCR se restringió con *NheI* y *BamHI* y se clonó en vector pCEP-Pu apropiadamente digerido. Las construcciones resultantes se transfectaron en células HEK 293-EBNA como se ha descrito previamente (44, 45). Las construcciones de expresión que codifican las formas unidas a membrana naturales (pHβ-CD5.WT) y truncadas en la cola citoplásmica (pHβ-CDS.K384^{STOP}) de CD5 (41) se transfectaron transitoriamente en células HEK 293 usando el reactivo Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen Life Technologies, Paisley, R.U.) según instrucciones del fabricante.

40 **Células.** Las células 2G5 negativas para CD5 y CD6 se obtuvieron por citometría y posterior clonación de células Jurkat (40) y se cultivaron en medio RPMI 1640 BioWhittaker (Lonza, Verviers, Bélgica) complementado con 10% de SBF (Invitrogen Life Technologies), 100 U/ml de penicilina G (Laboratorios ERN, Barcelona, España) y 50 µg/ml de estreptomycin (Laboratorios Normon, Madrid, España) a 37 °C y 5% de CO₂. Las células HEK 293-EBNA de riñón embrionario humano que expresan constitutivamente la proteína viral de Epstein-Barr EBNA-1, que permiten la replicación episómica del vector pCEP-Pu, fueron una amable donación del Dr. T. Sasaki y Dr. Timpl (Max Planck Institute for Biochemistry, Martinsried, Alemania). Estas células se cultivaron en DMEM/F12 complementado con 10% de SBF, 100 U/ml de penicilina G, 50 µg/ml de estreptomycin y 250 µg/ml de geneticina (G418, Sigma, St Louis, MO). Las células HEK 293 y HEK 293 que expresan establemente TLR2 (HEK 293-TLR2) fueron una amable donación del Dr. Golenbock (Escuela de Medicina de la Universidad de Massachusetts, Worcester, MA). Se añadió puromicina (50 µg/ml; Sigma) a medio de cultivo para la selección de transfectantes HEK 293-EBNA/pCEP-Pu y HEK 293-TLR2 estables.

50 **Expresión, purificación por afinidad y marcado con biotina de proteínas recombinantes.** Todas las proteínas humanas solubles recombinantes rshCD5, rshCD6, rshCD5.DI, rshCD5.DII y rshCD5.DIII se expresaron usando el sistema de expresión episómico pCEP-Pu/HEK 293-EBNA. Las proteínas rshCD5 y rshCD6 se purificaron de sobrenadantes de cultivo por cromatografía de afinidad con anticuerpos específicos (22, 43). Los ectodominios individuales de rshCD5 englobaron los aminoácidos R1-L113 (DI), A135-F271 (DII) y F271-D369 (DIII) de la proteína madura, y se usaron como sobrenadantes de cultivo sin suero sin fraccionar. La biotilación de proteínas se realizó con biotina activada con PEO-maleimida EZ-Link (Pierce/Perbo Science, Cheshire, R.U.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

60 **Estudios de unión bacteriana y fúngica.** Las cepas bacterianas (*S. aureus* y *E. coli*) y fúngicas (*C. albicans* y *C. neoformans*) usadas en este estudio son cepas aisladas clínicas caracterizadas por el Departamento de Microbiología del Hospital Clínico de Barcelona usando procedimientos bioquímicos convencionales. La cepa fúngica de *S. pombe* fue

- amablemente proporcionada por el Departamento de Biología celular y Patología de la Universidad de Barcelona. Las bacterias u hongos se cultivaron durante la noche en caldo Luria Bertoni (LB) a 30-37 °C con aireación y luego se recogieron por centrifugación a 3.500xg durante 10 min. Los sedimentos bacterianos o fúngicos se resuspendieron en TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) a una densidad final de 10¹⁰ bacterias o 10⁹ hongos por ml. La cuantificación se hizo sembrando diluciones de bacterias/hongos sobre agar. La unión de proteínas solubles recombinantes (rshCD5, rshCD6) se analizó como se ha descrito previamente (14).
- Para ensayos de competencia, 15 µg de rshCD5 se pre-incubaron con diferentes concentraciones de zymosan purificado de *S. cerevisiae* (Sigma), β-1-3-glucano de *Euglena gracilis* (Sigma), glucano de *S. cerevisiae* (Sigma) y β-D-glucano de cebada, (Sigma) o manano de *S. cerevisiae* (Sigma), durante 1 h a 4 °C, antes de la incubación con suspensiones bacterianas o fúngicas. Los estudios de unión fúngica con los ectodominios de DI, DII y DIII de rshCD5 se realizaron incubando 10⁸ hongos con 1 ml de sobrenadantes de cultivo respectivos durante la noche a 4 °C bajo rotación. La proteína sin unir se evaluó por precipitación con 10% de TCA. Estas muestras y las muestras de proteína sin unir se solubilizaron con tampón de muestra Laemmli, se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE y se analizaron por transferencia Western con un antisuero policlonal de conejo anti-CD5 producido en el laboratorio de los inventores más un antisuero de oveja dirigido contra Ig de conejo marcada con HRP (DAKO, Carpintería, CA).
- Ensayos de ELISA.** Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) durante la noche a 4 °C con 20 µg de LPS (purificado de *E. coli* 055:B5, Sigma), ácido lipoteicoico (LTA; Sigma), peptidoglicano (PGN; Sigma) o Zymosan (ZYM; Sigma) en tampón de recubrimiento (NaHCO₃ 100 mM, pH 9,5). Las placas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente (TA) con PBS que contenía 3% de BSA (Sigma). Entonces se añadieron diferentes concentraciones de BSA marcada con biotina, rshCD5 o rshCD6 a los pocillos y se incubaron durante 2 h a TA. La proteína unida se detectó mediante la adición de dilución 1:2000 de SA_v marcado con HRP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) durante 1 h a TA. Entre cada etapa de incubación, la proteína sin unir se eliminó lavando tres veces con PBS-0,01% de Tween-20. El ELISA se reveló añadiendo sustrato líquido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB; Sigma), y la absorbancia se leyó a 450 nm.
- Los ensayos de ELISA de competencia se realizaron como antes, excepto que se pre-incubaron 2 µg de rshCD5 o rshCD6 marcada con biotina con diferentes concentraciones de zymosan, β-D-glucano o manano, durante 1 h a 4 °C, antes de su adición a placas recubiertas de zymosan.
- El ELISA para la determinación de niveles en suero de IL-6 y IL-1β se realizó según el protocolo de los fabricantes (R&D Systems, Mineápolis, MN).
- Ensayos de agregación fúngica.** El marcado por fluorescencia de diferentes cepas fúngicas se hizo por incubación con FITC 100 mM durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Las células se recogieron por centrifugación a 3.000xg durante 5 min y después de varios lavados en PBS para eliminar FITC sin unir, los hongos se resuspendieron en 300 µl de PBS. Se añadieron cinco o 10 µg de rshCD5 o rshCD6 y se incubaron durante la noche a 4 °C bajo rotación orbital suave. Para fines de competencia, 10 µg de rshCD5 o rshCD6 se pre-incubaron durante 1 h a 4°C con 20 µg de zymosan, β-D-glucano o manano. Se transfirieron diez µl de la suspensión sobre portaobjetos de vidrio y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania). Las imágenes se analizaron con Photoshop 7.0 (Adobe Systems, San Jose, CA).
- Análisis de citometría de flujo.** La unión de zymosan a células 2G5 o 2G5-CD5.WT se realizó incubando 2x10⁵ células con diferentes cantidades de zymosan marcado con FITC de *S. cerevisiae* (Sigma) en tampón de bloqueo (PBS, 10% de suero AB humano, 2% de SBF y 0,02% de azida de sodio). Después de 1 h de incubación a 4 °C, las células se lavaron con PBS, 2% de SBF y 0,02% de azida de sodio y se analizaron en FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Los ensayos de competencia se realizaron incubando células 2G5-CD5.WT con 20 µg de zymosan marcado con FITC en presencia de diferentes cantidades (de 1 a 30 µg) de zymosan sin marcar, β-D-glucano o manano.
- Ensayos de liberación de citocinas IL-8.** Células HEK 293 y HEK 293 estables que expresan TLR² se transfectaron con pHβ-CD5.WT o pHβ-CD5.H418^{STOP} usando el reactivo Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) según instrucciones del fabricante. Veinticuatro horas después de la transfección, el medio se cambió a medio de crecimiento (véase anteriormente). La expresión de proteínas se evaluó por SDS-PAGE y transferencia Western con un antisuero policlonal de conejo anti-CD5 y se reveló por quimioluminiscencia con un antisuero de oveja anti-conejo marcado con HRP (DAKO). Las células transfectadas se pulsaron con 20 µg/ml de zymosan durante 24 h y se recogieron muestras de sobrenadante (100 µl) y se ensayaron para IL-8 por ELISA (BD OptEIA™, conjunto de ELISA de IL-8 humana, BD Biosciences, San Diego, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Ensayos de cinasa MAP.** Para fines de estimulación, 2x10⁷ células 2G5, 2G5-CD5.WT o 2G5-CD5.H418^{STOP} se dejaron morir durante 24 h en medio RPMI1640 sin SBF. A continuación, las células se suspendieron en 300 µl de medio RPMI1640 durante 10 min a 37 °C y se estimularon con 40 µg/ml de zymosan durante 0, 5, 15 ó 30 min a 37 °C. Las células se rompieron en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM y 0,1% de Triton X-100 que contenía 0,5 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de leupeptina y PMSF 1 mM). El contenido de proteína en el extracto de células se midió mediante el procedimiento de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA) y 20-30 µg de muestras de proteína se analizaron por SDS-PAGE y se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA). Las hojas se incubaron con TBS-T (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,05% de Tween-20) que

5 contenía 5% de leche en polvo desnatada durante 1 h a TA y luego se sondaron durante la noche a 4 °C en agitación con anticuerpos policlonales de conejo anti-pERK1/2 (sc-101760, dilución 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), monoclonales de ratón anti-pMEK (sc-81503, dilución 1:1000, Santa Cruz) o policlonales de conejo anti-cdk4 (sc-260, dilución 1:200; Santa Cruz). Después de lavar tres veces con TBS-T, la membrana se incubó con los anticuerpos policlonales de oveja dirigidos contra Ig de ratón o de conejo marcada con HRP correspondientes (dilución 1:2000; DAKO) durante 45 min a TA. Se lavaron tres veces con TBS-T, y una vez con TBS y se visualizaron por quimioluminiscencia potenciada con Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce) y exposición a películas X-OMAT (Kodak, Rochester, NY).

10 **Síndrome similar a choque séptico inducido por zymosan.** Ratones CD1 macho que pesaban 20-22 g (Charles River, Milán, Italia) se inyectaron i.p. con zymosan (500 mg/kg) en 250 µl de solución salina estéril (46). Se administró una dosis i.p. única de 25 µg de tanto rshCD5 como BSA 1 h antes de la exposición a zymosan. Un tercer grupo de ratones recibió el mismo volumen de solución salina estéril con una administración previa de 25 µg de BSA. 18 h después de la exposición a zymosan, la gravedad clínica de la toxicidad sistémica se puntuó en un escala subjetiva que oscilaba de 0 a 3 en la que 0 = ausencia, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = grave. La escala de clasificación se usó para cada signo tóxico observado en los ratones (letargo, diarrea, pelo alborotado y conjuntivitis). Los valores de cada signo tóxico de cada grupo se sumaron dando una puntuación final.

20 Para la evaluación del recuento de leucocitos total en el peritoneo, 5 ml de PBS se inyectaron en la cavidad abdominal mediante una incisión en la línea alba, y el mismo volumen se recuperó después de un masaje peritoneal de 10 segundos. Las mediciones se hicieron con un contador de células automático (Micros 60, ABX Diagnostics, Montpellier, Francia). Las muestras de hígado se congelaron en nitrógeno líquido hasta que se usaron para la evaluación de la actividad de mieloperoxidasa (MPO) como se ha descrito previamente (47).

25 La mortalidad de cada grupo se monitorizó durante un periodo 12 días y se expresó como el porcentaje de supervivencia de ratones. El procedimiento experimental fue autorizado por el comité de ética de la Universidad de Barcelona y se realizó según pautas de cuidado animal institucionales que cumplen reglamentaciones en España (RD 1201/2005), Europa (86/609) y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de la Salud.

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

Bibliografía

1. Janeway, C.A., Jr. y R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
2. Gordon, S. 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111:927-930.
3. Freeman, M., J. Ashkenas, D.J. Rees, D.M. Kingsley, N.G. Copeland, N.A. Jenkins y M. Krieger. 1990. An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8810-8814.
4. Sarrias, M.R., J. Gronlund, O. Padilla, J. Madsen, U. Holmskov y F. Lozano. 2004. The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit Rev Immunol* 24:1-37.
5. Rodamilans, B., I.G. Munoz, E. Bragado-Nilsson, M.R. Sarrias, O. Padilla, F.J. Blanco, F. Lozano y G. Montoya. 2007. Crystal structure of the third extracellular domain of CD5 reveals the fold of a group B scavenger cysteine-rich receptor domain. *J Biol Chem* 282:12669-12677.
6. Liu, Y. y S. Shaw. 2001. The human genome: an immuno-centric view of evolutionary strategies. *Trends Immunol* 22:227-229.
7. Bodian, D.L., J.E. Skonier, M.A. Bowen, M. Neubauer, A.W. Siadak, A. Aruffo y J. Bajorath. 1997. Identification of residues in CD6 which are critical for ligand binding. *Biochemistry* 36:2637-2641.
8. Skonier, J.E., D.L. Bodian, J. Emswiler, M.A. Bowen, A. Aruffo y J. Bajorath. 1997. Mutational analysis of the CD6 ligand binding domain. *Protein Eng* 10:943-947.
9. Kristiansen, M., J.H. Graversen, C. Jacobsen, O. Sonne, H.J. Hoffman, S.K. Law y S.K. Moestrup. 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409:198-201.
10. Doi, T., K. Higashino, Y. Kurihara, Y. Wada, T. Miyazaki, H. Nakamura, S. Uesugi, T. Imanishi, Y. Kawabe, H. Itakura y col. 1993. Charged collagen structure mediates the recognition of negatively charged macromolecules by macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem* 268:2126-2133.
11. Elomaa, O., M. Sankala, T. Pikkarainen, U. Bergmann, A. Tuuttila, A. Raatikainen-Ahokas, H. Sariola y K. Tryggvason. 1998. Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacteria-binding region. *J Biol Chem* 273:4530-4538.
12. Jiang, Y., P. Oliver, K.E. Davies y N. Platt. 2006. Identification and characterization of murine SCARA5, a novel class A scavenger receptor that is expressed by populations of epithelial cells. *J Biol Chem* 281:11834-11845.
13. Peiser, L., P.J. Gough, T. Kodama y S. Gordon. 2000. Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. *Infect Immun* 68:1953-1963.
14. Sarrias, M.R., S. Rosello, F. Sanchez-Barbero, J.M. Sierra, J. Vila, J. Yelamos, J. Vives, C. Casals y F. Lozano. 2005. A role for human Sp alpha as a pattern recognition receptor. *J Biol Chem* 280:35391-35398.
15. Lecomte, O., J.B. Bock, B.W. Birren, D. Vollrath y J.R. Parnes. 1996. Molecular linkage of the mouse CD5 and CD6 genes. *Immunogenetics* 44:385-390.
16. Padilla, O., J. Calvo, J.M. Vila, M. Arman, I. Gimferrer, L. Places, M.T. Arias, M.A. Pujana, J. Vives y F. Lozano. 2000. Genomic organization of the human CD5 gene. *Immunogenetics* 51:993-1001.
17. Berland, R. y H.H. Wortis. 2002. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* 20:253-300.
18. Jones, N.H., M.L. Clabby, D.P. Dialynas, H.J. Huang, L.A. Herzenberg y J.L. Strominger. 1986. Isolation of complementary DNA clones encoding the human lymphocyte glycoprotein T1/Leu-1. *Nature* 323:346-349.
19. Aruffo, A., M.B. Melnick, P.S. Linsley y B. Seed. 1991. The lymphocyte glycoprotein CD6 contains a repeated domain structure characteristic of a new family of cell surface and secreted proteins. *J Exp Med* 174:949-952.
20. Lankester, A.C., G.M. van Schijndel, J.L. Cordell, C.J. van Noesel y R.A. van Lier. 1994. CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex. *Eur J Immunol* 24:812-816.
21. Gimferrer, I., M. Farnos, M. Calvo, M. Mittelbrunn, C. Enrich, F. Sanchez-Madrid, J. Vives y F. Lozano. 2003. The accessory molecules CD5 and CD6 associate on the membrane of lymphoid T cells. *J Biol Chem* 278:8564-8571.
22. Gimferrer, I., M. Calvo, M. Mittelbrunn, M. Farnos, M.R. Sarrias, C. Enrich, J. Vives, F. Sanchez-Madrid y F. Lozano.

2004. Relevance of CD6-mediated interactions in T cell activation and proliferation. *J Immunol* 173:2262-2270.
23. Lozano, F., M. Simarro, J. Calvo, J.M. Vila, O. Padilla, M.A. Bowen y K.S. Campbell. 2000. CD5 signal transduction: positive or negative modulation of antigen receptor signaling. *Crit Rev Immunol* 20:347-358.
- 5 24. Brossard, C., M. Semichon, A. Trautmann y G. Bismuth. 2003. CD5 Inhibits Signaling at the Immunological Synapse Without Impairing Its Formation. *J Immunol* 170:4623-4629.
25. Hassan, N.J., A.N. Barclay y M.H. Brown. 2004. Frontline: Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166. *Eur J Immunol* 34:930-940.
26. Zimmerman, A.W., B. Joosten, R. Torensma, J.R. Parnes, F.N. van Leeuwen y C.G. Figdor. 2006. Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood* 107:3212-3120.
- 10 27. Raman, C. 2002. CD5, an important regulator of lymphocyte selection and immune tolerance. *Immunol Res* 26:255-263.
28. Ibanez, A., M.R. Sarrias, M. Farnos, I. Gimferrer, C. Serra-Pages, J. Vives y F. Lozano. 2006. Mitogen-activated protein kinase pathway activation by the CD6 lymphocyte surface receptor. *J Immunol* 177:1152-1159.
- 15 29. Hassan, N.J., S.J. Simmonds, N.G. Clarkson, S. Hanrahan, M.J. Puklavec, M. Bomb, A.N. Barclay y M.H. Brown. 2006. CD6 regulates T-cell responses through activation-dependent recruitment of the positive regulator SLP-76. *Mol Cell Biol* 26:6727-6738.
30. Castro, M.A., M.I. Oliveira, R.J. Nunes, S. Fabre, R. Barbosa, A. Peixoto, M.H. Brown, J.R. Parnes, G. Bismuth, A. Moreira, B. Rocha y A.M. Carmo. 2007. Extracellular isoforms of CD6 generated by alternative splicing regulate targeting of CD6 to the immunological synapse. *J Immunol* 178:4351-4361.
- 20 31. Van de Velde, H., I. von Hoegen, W. Luo, J.R. Parnes y K. Thielemans. 1991. The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Nature* 351:662-665.
32. Biancone, L., M.A. Bowen, A. Lim, A. Aruffo, G. Andres y I. Stamenkovic. 1996. Identification of a novel inducible cell-surface ligand of CD5 on activated lymphocytes. *J Exp Med* 184:811-819.
- 25 33. Calvo, J., L. Places, O. Padilla, J.M. Vila, J. Vives, M.A. Bowen y F. Lozano. 1999. Interaction of recombinant and natural soluble CD5 forms with an alternative cell surface ligand. *Eur J Immunol* 29:2119-2129.
34. Pospisil, R., M.G. Fitts y R.G. Mage. 1996. CD5 is a potential selecting ligand for B cell surface immunoglobulin framework region sequences. *J Exp Med* 184:1279-1284.
35. Haas, K.M. y D.M. Estes. 2001. The identification and characterization of a ligand for bovine CD5. *J Immunol* 166:3158-3166.
- 30 36. Hohenester, E., T. Sasaki y R. Timpl. 1999. Crystal structure of a scavenger receptor cysteine-rich domain sheds light on an ancient superfamily. *Nat Struct Biol* 6:228-232.
37. Calvo, J., L. Places, G. Espinosa, O. Padilla, J.M. Vila, N. Villamor, M. Ingelmo, T. Gallart, J. Vives, J. Font y F. Lozano. 1999. Identification of a natural soluble form of human CD5. *Tissue Antigens* 54:128-137.
- 35 38. Ramos-Casals, M., J. Font, M. Garcia-Carrasco, J. Calvo, L. Places, O. Padilla, R. Cervera, M.A. Bowen, F. Lozano y M. Ingelmo. 2001. High circulating levels of soluble scavenger receptors (sCD5 and sCD6) in patients with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 40:1056-1059.
39. Sarrias, M.R., M. Farnos, R. Mota, F. Sanchez-Barbero, A. Ibanez, I. Gimferrer, J. Vera, R. Fenutria, C. Casals, J. Yelamos y F. Lozano. 2007. CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns and protects from LPS-induced septic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11724-11729.
- 40 40. Simarro, M., C. Pelassy, J. Calvo, L. Places, C. Aussel y F. Lozano. 1997. The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent and -independent diacylglycerol production. *J Immunol* 159:4307-4315.
41. Calvo, J., J.M. Vilda, L. Places, M. Simarro, O. Padilla, D. Andreu, K.S. Campbell, C. Aussel y F. Lozano. 1998. Human CD5 signaling and constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues by casein kinase II. *J Immunol* 161:6022-6029.
- 45 42. Genovese, T., R. Di Paola, P. Catalano, J.H. Li, W. Xu, E. Massuda, A.P. Caputi, J. Zhang y S. Cuzzocrea. 2004. Treatment with a novel poly(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor reduces development of septic shock-like syndrome induced by zymosan in mice. *Crit Care Med* 32:1365-1374.
43. Sarrias, M.R., O. Padilla, Y. Monreal, M. Carrascal, J. Abian, J. Vives, J. Yelamos y F. Lozano. 2004. Biochemical

characterization of recombinant and circulating human Spalpa. *Tissue Antigens* 63:335-344.

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

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

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

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

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundació Clinic per a la Recerca Biomèdica, Hospital Clinic i Provincial de Barcelona y Universitat de Barcelona.

20 <120 > Composiciones farmacéuticas de CD5

<130> 113/08

25 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

30 <211> 30

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

35 <223> Cebador de sentido directo rshCD5.DI

<400> 1

ggacggctag cacggctcag ctggtatgac 30

<210> 2

40 <211> 29

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

45 <223> Cebador de sentido inverso rshCD5.DI

<400> 2

gtggatccta atcctggcat gtgacaaac 29

<210> 3

50 <211> 29

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

55 <223> Cebador de sentido directo rshCD5.DII

<400> 3

60 ggacggctag ctgctcctcc caggctgca 29

ES 2 429 426 T3

<210> 4
<211> 28
<212> ADN
<213> Homo sapiens
5
<220>
<223> Cebador de sentido inverso rshCD5.DII
10 <400> 4
gtgatcctag aaacctgagc aaaggagg 28

REIVINDICACIONES

1. Ectodominio soluble de CD5 humana para su uso en un procedimiento de prevención y/o tratamiento de infección fúngica y/o septicemia fúngica y/o cualquier trastorno inflamatorio desencadenado por componentes fúngicos.
- 5 2. Ectodominio soluble de CD5 humana para el uso según la reivindicación 1, en el que la infección y/o septicemia y/o el trastorno inflamatorio es producido por *Candida albicans* o *Cryptococcus neoformans*.
3. Una composición farmacéutica que comprende el ectodominio soluble de CD5 humana y al menos un excipiente farmacéutico para su uso en un procedimiento de prevención y/o tratamiento de infección fúngica y/o septicemia fúngica y/o cualquier trastorno inflamatorio desencadenado por componentes fúngicos.
- 10 4. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 3, en la que el excipiente está seleccionado de sacarosa y glicerol.
5. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 3, en la que la composición está en forma inyectable.
- . La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en la que la infección y/o septicemia y/o el trastorno inflamatorio es producido por *Candida albicans* o *Cryptococcus neoformans*.

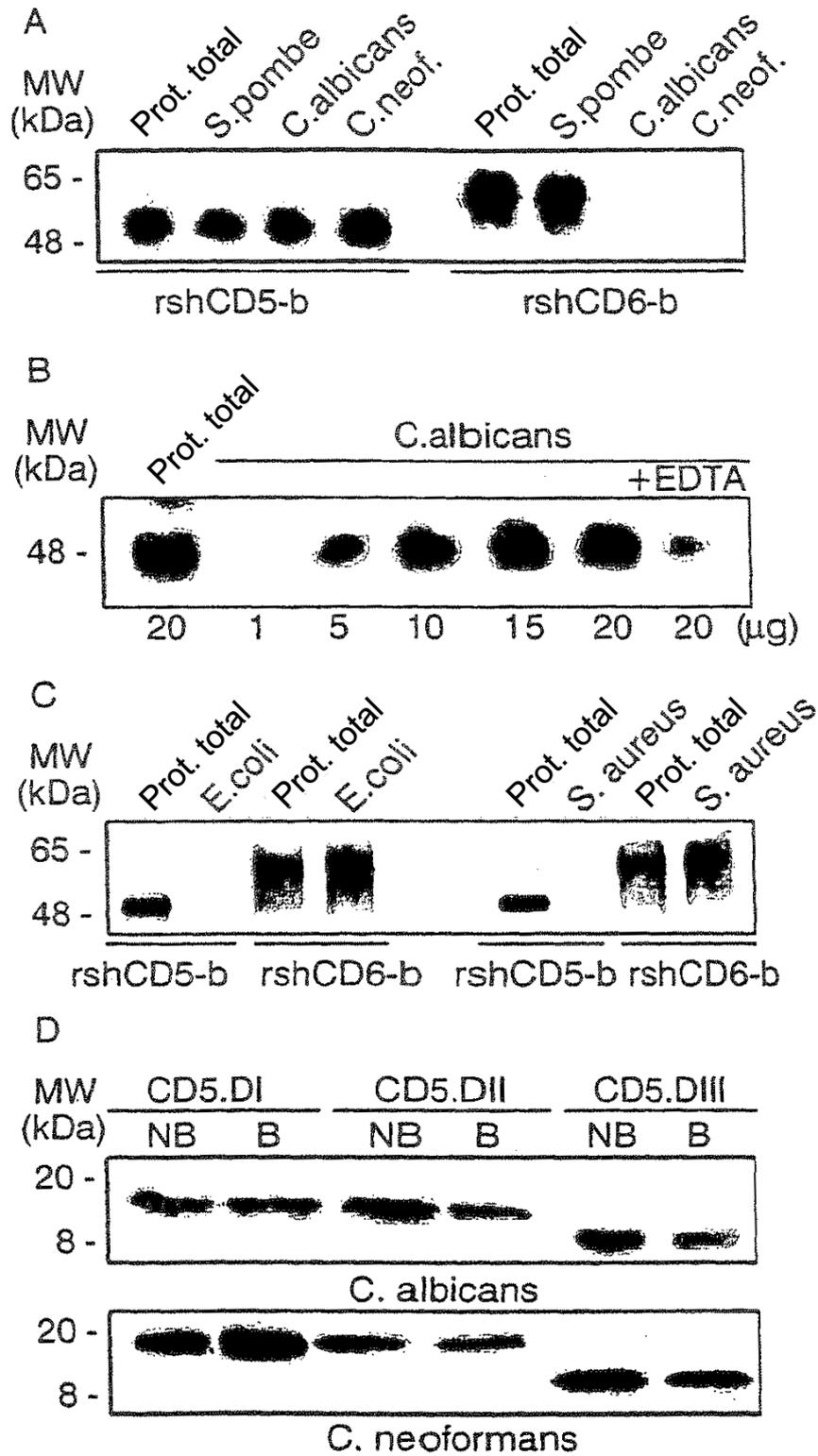


FIG. 1

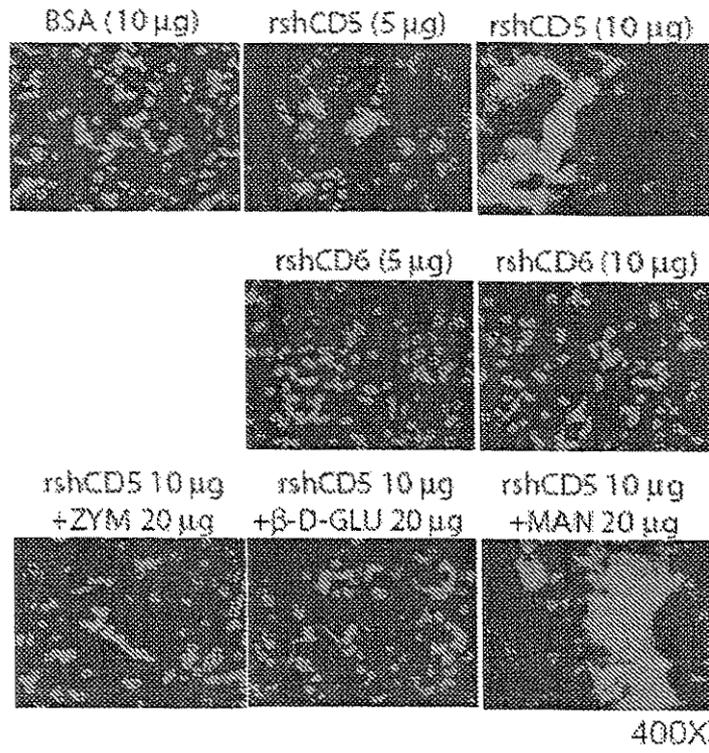


FIG. 2

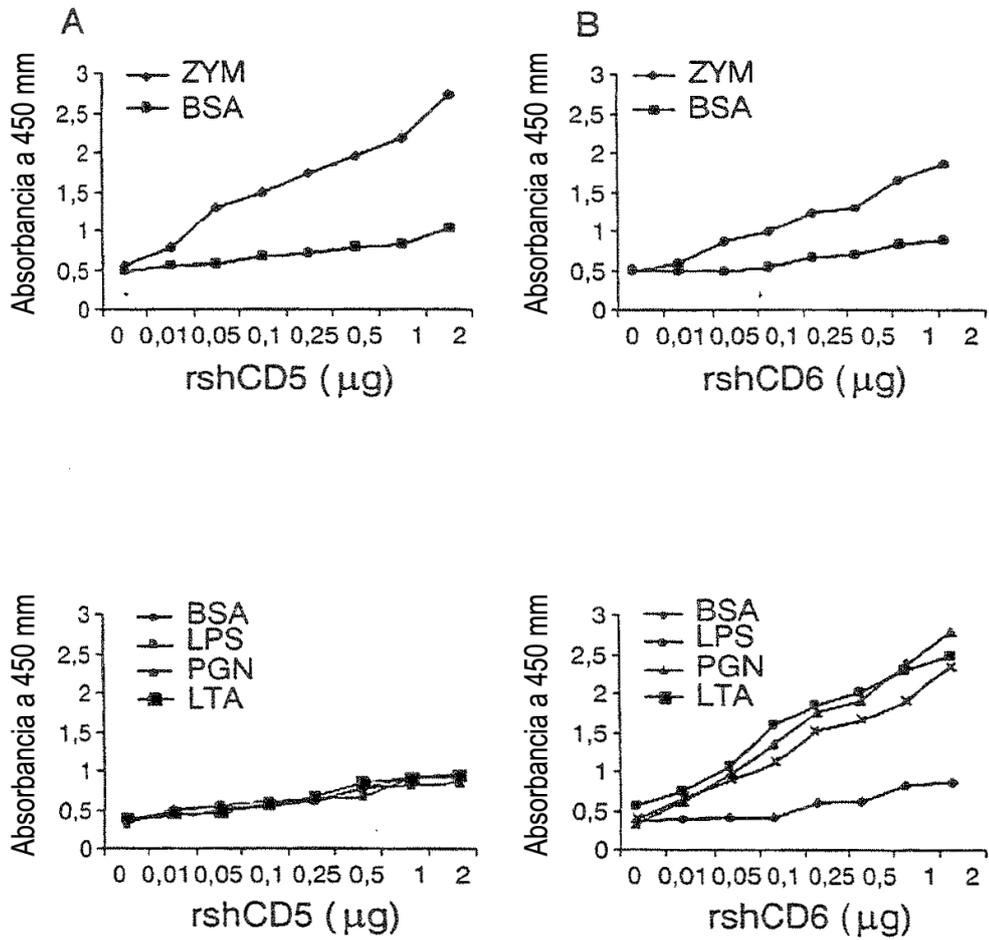


FIG. 3

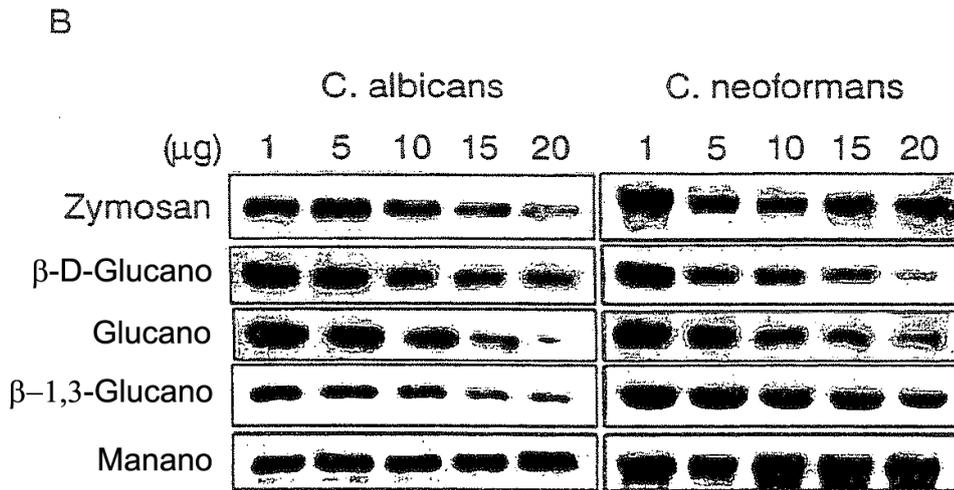
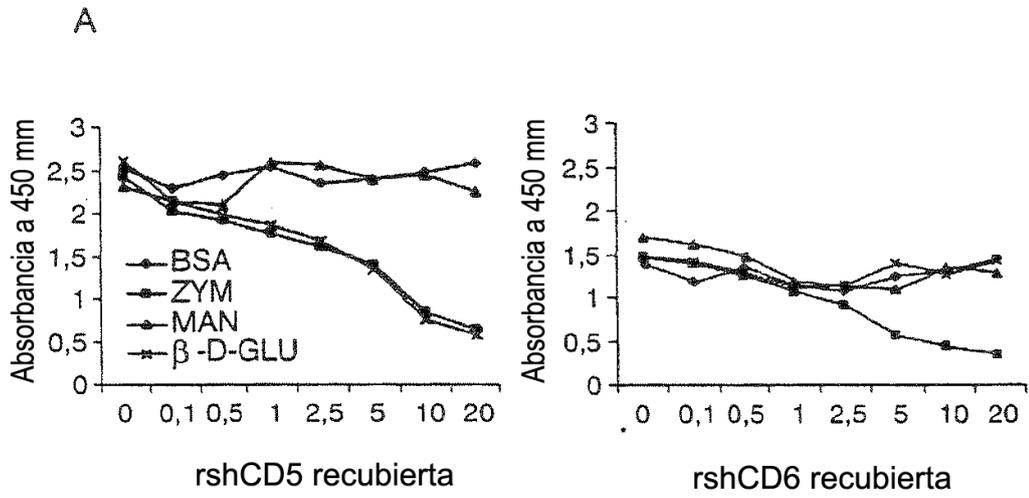


FIG. 4

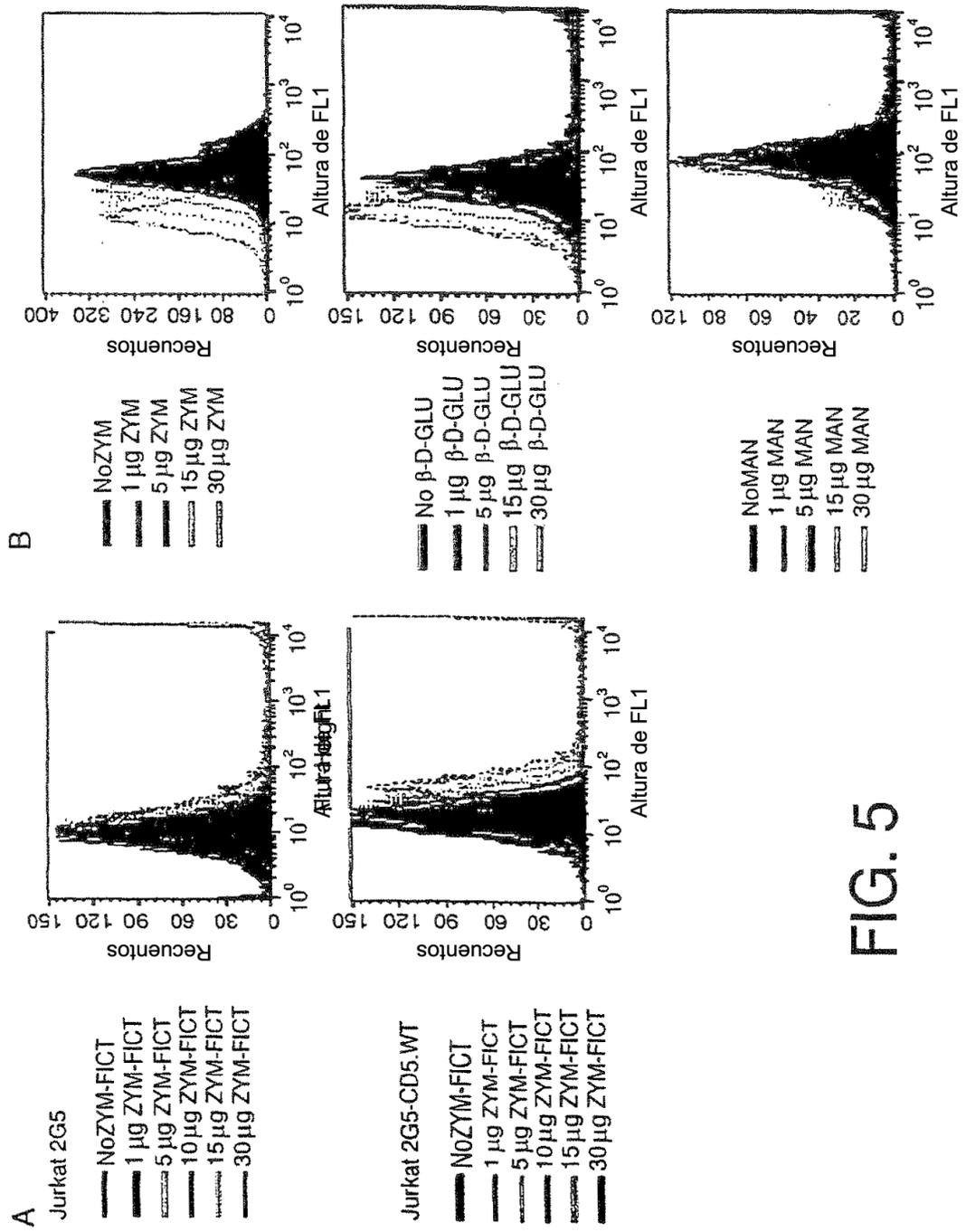


FIG. 5

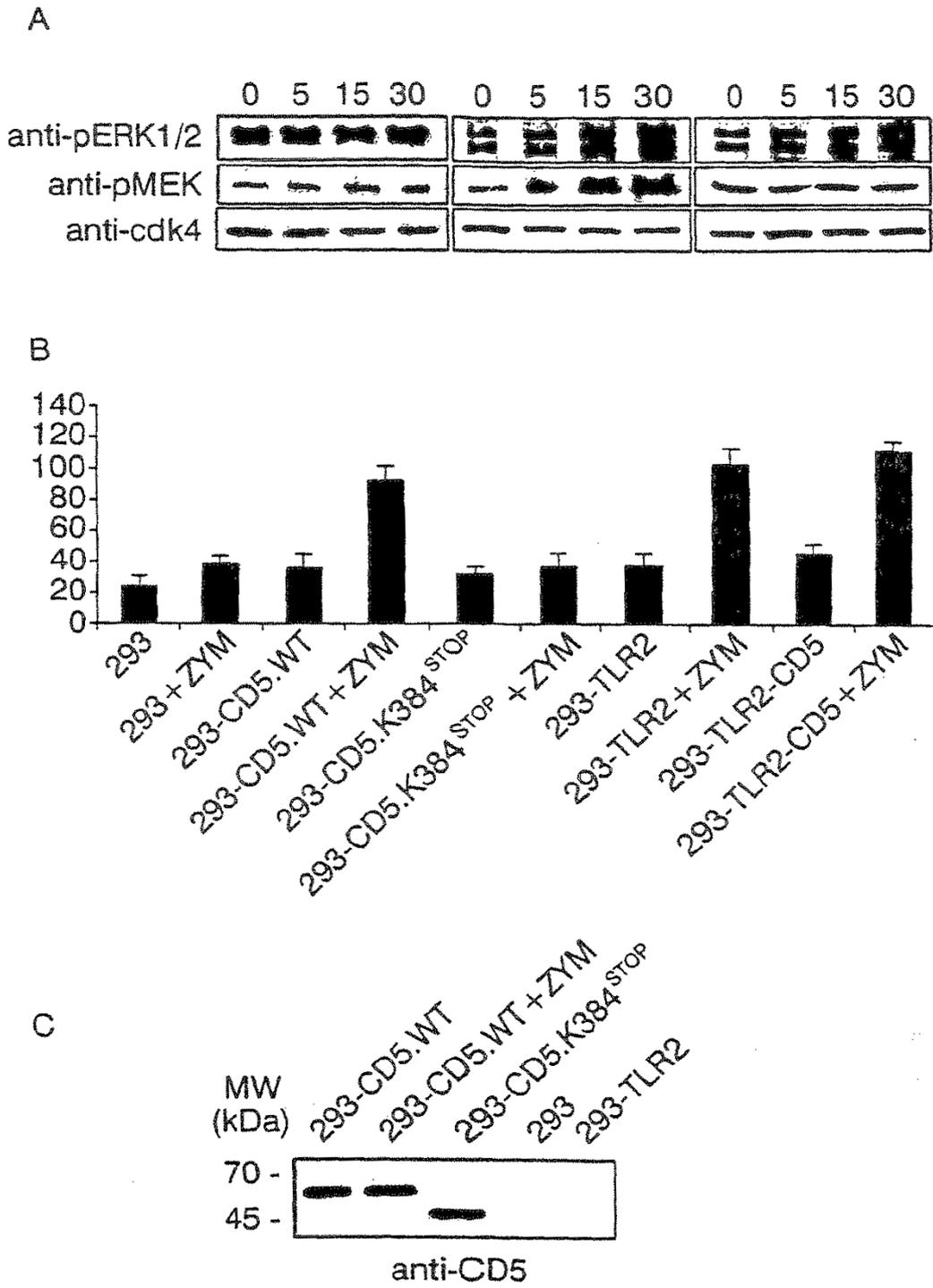


FIG. 6

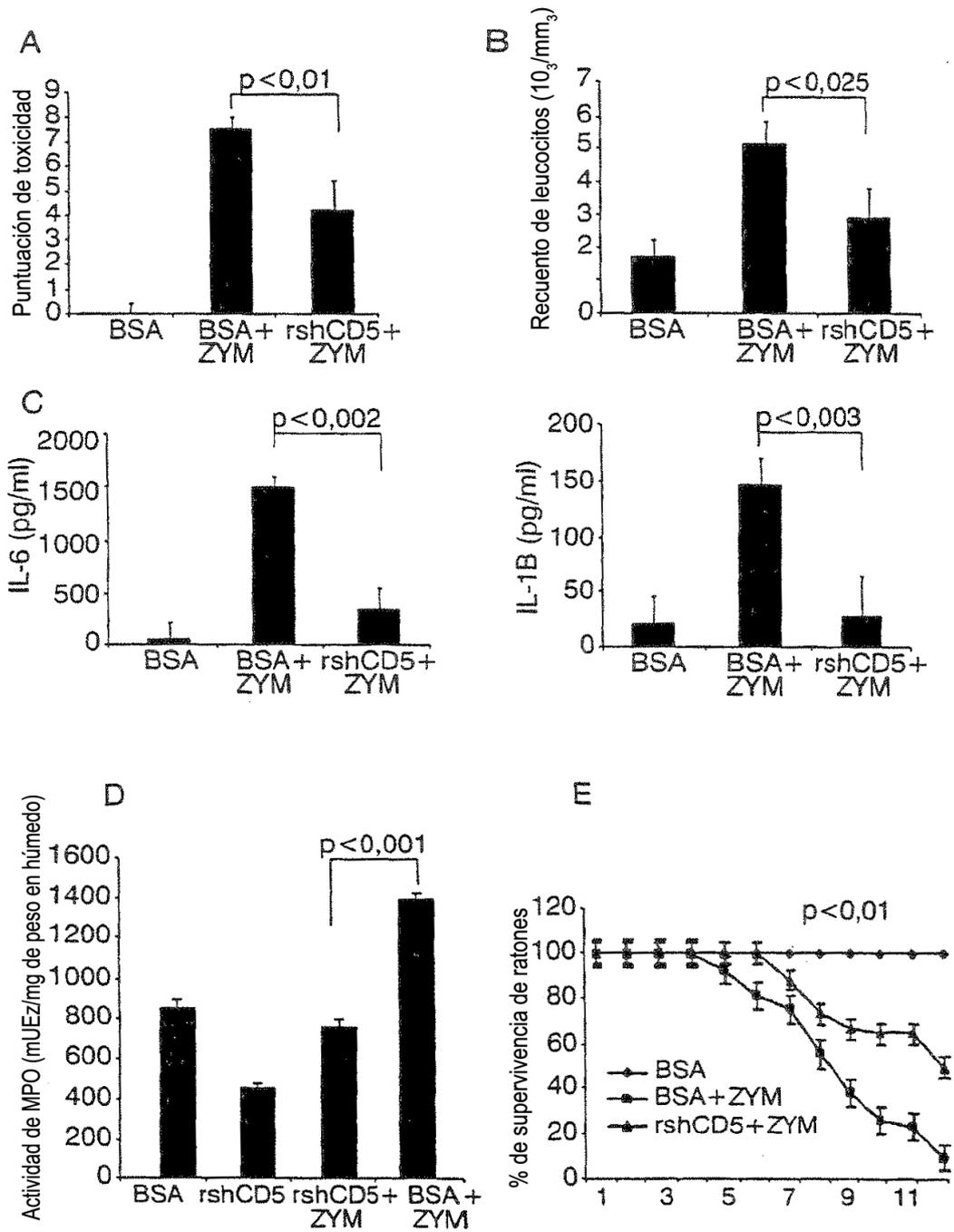


FIG. 7