

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 389**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2008** **E 08750412 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015** **EP 2143436**

54 Título: **Producto de CD6 para el tratamiento de enfermedades infecciosas y procesos inflamatorios relacionados**

30 Prioridad:

**28.03.2007 ES 200700893**

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

**06.11.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA (100.0%)  
CENTRO DE PATENTES DE LA UB BALDIRI  
REIXAC, 4  
08028 BARCELONA, ES**

72 Inventor/es:

**SARRIAS FORNÉS, MARIA ROSA y  
LOZANO SOTO, FRANCISCO**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

**ES 2 550 389 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

Producto de CD6 para el tratamiento de enfermedades infecciosas y procesos inflamatorios relacionados

5 Esta invención se refiere al campo de la medicina, y específicamente a compuestos de naturaleza proteica para la fabricación de medicamentos para el tratamiento terapéutico y/o preventivo de enfermedades infecciosas y de estados inflamatorios relacionados con las mismas.

**Antecedentes de la técnica**

10 La infección microbiana sistémica y la liberación de productos microbianos inducen la hiperactivación de células inmunitarias del huésped, generando posteriormente una respuesta inflamatoria agravada. La sepsis puede dar como resultado la incapacidad del sistema inmunitario para controlar esta inflamación, y puede acabar en lesión tisular, aumento de la permeabilidad vascular y puede provocar insuficiencia multiorgánica y choque (choque séptico).

15 La sepsis puede resultar de muchas causas pero normalmente se desencadena por neumonía, traumatismo, cirugía y quemaduras, o por estados tales como cáncer o SIDA. La sepsis comienza habitualmente con temblor, fiebre, disminución de la tensión arterial (choque séptico), respiración rápida, frecuencia cardíaca rápida y lesiones de la piel. En el plazo de horas, la sepsis puede provocar coagulación espontánea en vasos sanguíneos, hipotensión grave, insuficiencia multiorgánica, choque, gangrena y finalmente muerte. La sepsis provoca alta morbimortalidad en humanos y otros animales (mortalidad de hasta el 70% en pacientes con sepsis). En los Estados Unidos y Europa, 20 1,5 millones de personas desarrollan sepsis anualmente. El 30% de estos pacientes mueren tras un mes y el 20% tras seis meses. En los Estados Unidos, la sepsis es la 10ª causa de muerte, lo que representa una mortalidad mayor que la provocada por infarto, cáncer de mama o cáncer de pulmón.

25 La intervención más importante en la sepsis es un rápido diagnóstico y tratamiento. El diagnóstico de la sepsis puede ser difícil. Algunos de sus síntomas, tales como fiebre, pulso rápido y dificultad respiratoria se producen frecuentemente y pueden confundirse como debidos a otros trastornos. Los pacientes a los que se les diagnostica sepsis grave se ingresan habitualmente en la unidad de cuidados intensivos (UCI) del hospital para un tratamiento especial. El tratamiento de primera línea es identificar y eliminar la infección subyacente con agentes contra la infección o cirugía para drenar el sitio de infección. Los métodos actuales para tratar la sepsis incluyen antibacterianos, anticuerpos, péptidos y una proteína C activada humana recombinante denominada drotecogina 30 alfa, comercializada por Eli Lilly como Xigris®. Sin embargo, la drotecogina alfa sólo reduce la mortalidad asociada con sepsis grave en un 5%, y no todos los pacientes responden positivamente a este fármaco. También se ha mostrado recientemente que los esteroides son valiosos en pacientes con choque séptico. El médico también administra fluidos intravenosos para impedir que la tensión arterial disminuya demasiado. En algunos casos, son necesarias medicaciones vasopresoras (que estrechan los vasos sanguíneos) para lograr una tensión arterial adecuada. Finalmente, si se producen insuficiencias orgánicas, se proporcionan cuidados paliativos apropiados (por ejemplo, diálisis para insuficiencia renal, ventilación mecánica para la insuficiencia respiratoria, etc.).

35 Debido al alto nivel de redundancia con respecto a los mediadores moleculares en la respuesta frente a la sepsis, es probable que los nuevos enfoques se centren en la intervención en múltiples puntos en la cascada de la sepsis. Algunos candidatos a fármaco en fase temprana de desarrollo son un antagonista de receptor, receptor desencadenante expresado en células mieloides-1 (TREM-1) (Merck & Co Inc y BioXcell SpA); un antagonista de superantígeno (Atox Bio Ltd.), un péptido corto que bloquea la acción de una familia de toxinas bacterianas mortales producidas por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, denominadas superantígenos; hormona reguladora inmunitaria (IRH, Hollis-Eden Pharmaceuticals Inc.), un fármaco autoinmunitario y antiinflamatorio que controla el sistema inmunitario y funciones metabólicas; y un antagonista de receptor de adenosina A1 como 40 tratamiento para septicemia por bacterias Gram-negativas (Endacea Inc.). Otras moléculas en desarrollo son antagonistas del receptor de tipo Toll-4 (Takeda y Eisai); fragmento de anticuerpo policlonal anti-TNF-alfa (Protherics); fosfatasa alcalina derivada de intestino bovino (AM-Pharma); Noratiol (Medinox), que neutraliza el óxido nítrico; y antitrombina III transgénica ATryn® (GTC Biotherapeutics) que recibió la aprobación de comercialización de las autoridades reguladoras europeas en 2006 y está en ensayos clínicos de fase tardía en los Estados Unidos.

55 Se han propuestos otros enfoques para tratar la sepsis, tales como: anticuerpos anti-IL-8 (solicitud de patente estadounidense 2003002178A), anticuerpos anti-IL-18 (documento US 20030008822A), anticuerpos anti-C5a y péptidos C5a truncados C-terminales (documento US 20020165138A), quimiocinas y fragmentos de quimiocinas (documento US 20020155094A), una combinación de proteína C y anticuerpos frente a BPI (documento US 20020044929A), inhibidores de COX-2 (documento US 20020006915A), lipopolisacáridos de algas (documento US 6534648) y el uso de un anticuerpo frente a TNF- $\alpha$  y un anticuerpo frente a lipopolisacárido bacteriano (documento US 6315999). Sin embargo, a pesar de los importantes avances de las últimas varias décadas en el tratamiento de infecciones graves, la incidencia de sepsis y la mortalidad debida a sepsis siguen aumentando. Por tanto, parece deseable proporcionar nuevos métodos y composiciones para la prevención y el tratamiento de enfermedades 60 infecciosas y de estados inflamatorios relacionados con estas enfermedades infecciosas.

## Sumario de la invención

Los inventores han encontrado que el ectodominio de CD6 humano, un receptor de superficie celular expresado principalmente por células del linaje linfoide, puede unirse a estructuras microbianas conservadas tales como lipopolisacárido (LPS) y ácido lipoteicoico (LTA) de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, respectivamente. Sorprendentemente, la interacción LPS-CD6 muestra una relativa alta afinidad de magnitud similar a la notificada para la interacción de LPS con CD14, el receptor de LPS más importante en células de mamífero. CD6 se une a Re-LPS de manera aproximadamente 10 veces más fuerte que Sp $\alpha$ , otro receptor con dominios ricos en cisteína de receptor de tipo scavenger (SRCR). Estos datos condujeron al hallazgo de que la administración i.p. de una forma recombinante de CD6 suprime los efectos letales provocados por el choque séptico inducido por LPS en ratones. Por consiguiente, CD6 tiene potencial terapéutico para la intervención del síndrome de choque séptico y de otras enfermedades inflamatorias relacionadas con enfermedades infecciosas.

Las respuestas inmunitarias innatas se basan en la capacidad de múltiples receptores codificados en la línea germinal no polimórficos para reconocer los denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que son productos conservados de patógenos microbianos, no compartidos por el huésped, y esenciales para su supervivencia. Los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) se expresan principalmente por células fagocíticas (granulocitos, macrófagos, células dendríticas) y células de barreras epiteliales. Se ha mostrado que algunos de ellos interaccionan directamente con una variedad de componentes microbianos. En el presente documento, los inventores han encontrado sorprendentemente que CD6, un miembro de la superfamilia de SRCR expresado en linfocitos humanos, se une a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como a otras estructuras microbianas (virales, fúngicas). El papel principal notificado de CD6 es la modulación de la activación de células T y señales de diferenciación. Es sorprendente que, además, CD6 tiene la capacidad de detectar la presencia de componentes microbianos. Esta es una actividad sorprendente de los linfocitos, puesto que esta actividad se ha relacionado con macrófagos, que expresan receptores tales como CD14 y Sp $\alpha$ . De manera interesante, experimentos de unión competitiva muestran que la interacción de CD6 con las superficies bacterianas es específica. En contraposición a CD6, la forma recombinante que abarca el ectodominio de CD5 no se une a bacterias o a LPS. Los datos también muestran que CD6 se une a LTA y LPS a través de sitios independientes y no solapantes de la molécula.

La presencia de CD6 induce agregación bacteriana. Los datos de agregación bacteriana, junto con la agregación de LPS inducida por CD6 en presencia de Ca<sup>2+</sup>, indican que CD6 puede contribuir a aumentar el tamaño de las bacterias invasoras así como de las partículas de LPS. Esto facilitaría la eliminación de partículas de la circulación, y reduciría los procesos inflamatorios posteriores, que en casos tales como sepsis pueden resultar ser incluso mortales. Por consiguiente, la administración de una única dosis (25  $\mu$ g) de CD6 a ratones una hora antes de la exposición a LPS potenció significativamente su tasa de supervivencia (hasta el 70%) en comparación con el tratamiento con CD5 o solución salina, e indujo simultáneamente una reducción significativa en los niveles séricos de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en estos ratones.

Se han detectado bajos niveles de CD6 soluble en sueros humanos normales mediante ensayos ELISA, pero su caracterización bioquímica no se ha logrado hasta la actualidad. Usando técnicas de cromatografía de afinidad, se ha purificado una proteína CD6 soluble natural (nsCD6) a partir de sueros humanos acumulados con características de peso molecular (PM), reactividad de anticuerpos y unión a células similares a las de la forma recombinante de CD6, y compuesta exclusivamente por el ectodominio de CD6 humano. Estos datos, junto con la capacidad compartida para unirse a LPS en ensayos ELISA, indican que CD6 conserva la actividad biológica de la forma circulante de CD6 y validan el uso de CD6 recombinante en los estudios dada la baja disponibilidad de CD6 natural (está presente en el suero a concentraciones de alrededor de 5,27 ng/ml). Estos resultados también validan el posible uso de una forma recombinante de CD6 que va a administrarse a un paciente.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un producto de CD6 para su uso en el tratamiento terapéutico y/o preventivo, en un mamífero incluyendo un humano, de una enfermedad infecciosa, o de un estado inflamatorio relacionado con una enfermedad infecciosa, e indujo simultáneamente una reducción significativa en los niveles séricos de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en estos ratones.

En una realización particular de la invención, la enfermedad infecciosa es una infección microbiana. En realizaciones más particulares, la infección microbiana se selecciona del grupo que consiste en una infección bacteriana (bacterias o bien Gram-negativas o bien Gram-positivas), una infección parasitaria, una infección viral, una infección fúngica y combinaciones de las mismas (infección polimicrobiana).

En otra realización particular, la enfermedad infecciosa es una septicemia. Tal como se usa en el presente documento, el término "septicemia" se refiere a la presencia de cualquier microbio en el torrente sanguíneo. Particularmente, la septicemia se selecciona del grupo que consiste en una bacteriemia, una viremia, una fungemia, una parasitemia y combinaciones de las mismas.

Se encuentra la presencia de microbios viables en la mayoría de los casos estados inflamatorios relacionados con una enfermedad infecciosa, mientras que del 20% al 30% de pacientes no tienen microbios identificados de ninguna

fuerza sino productos derivados de los mismos. Por tanto, en otra realización, el estado inflamatorio se refiere a un producto derivado de un agente infeccioso. Particularmente, el agente infeccioso se selecciona del grupo que consiste en una bacteria, un parásito, un virus, un hongo, y combinaciones de los mismos.

5 La sepsis se define como la presencia o presunta presencia de una infección acompañada por evidencias de una respuesta sistémica denominada síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). Para la definición de sepsis, se hace referencia al artículo "Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines", H.B. Nguyen *et al.*, Ann. Emergency Med. 2006, vol. 48, págs. 28-54. La sepsis está provocada habitualmente por infecciones bacterianas (bacterias o bien Gram-negativas o bien Gram-positivas) pero también puede estar provocada por otros patógenos. Sin embargo, con la mayor frecuencia, la sepsis está provocada por infecciones por bacterias Gram-negativas. Sin embargo, en este caso la lesión y los síntomas atribuibles a la sepsis no sólo están provocados por las bacterias sino que también están provocados por un componente de la pared celular bacteriana conocido como endotoxina o LPS. Las moléculas de LPS son glicolípidos que son ubicuos en la membrana externa de bacterias Gram-negativas. Se libera LPS cuando el sistema inmunitario destruye las bacterias invasoras. Este LPS liberado se une a monocitos, macrófagos y células endoteliales y desencadena la producción de diversos mediadores tales como TNF- $\alpha$  e interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8). La producción de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8 en exceso es una causa principal de formas graves de sepsis.

20 En una realización particular de la invención, el estado inflamatorio es SIRS. En otra realización particular, el estado inflamatorio es sepsis. SIRS se define como la presencia de dos o más de lo siguiente: (1) temperatura mayor de 38°C o menor de 36°C; (2) frecuencia del pulso mayor de 90 latidos/min; (3) frecuencia respiratoria mayor de 20 respiraciones/min (o PCO<sub>2</sub> menor de 32 torr); y (4) recuento de glóbulos blancos mayor de 12000/mm<sup>3</sup> o menor de 4000/mm<sup>3</sup>, o más de un 10% de formas en banda inmaduras.

25 En otra realización particular, el estado inflamatorio es sepsis grave. La sepsis grave se define como la sepsis que está acompañada por una o más disfunciones orgánicas. La disfunción orgánica puede definirse como lesión pulmonar aguda; anomalías de la coagulación; trombocitopenia; estado mental alterado; insuficiencia renal, hepática o cardíaca; o hipoperfusión con acidosis láctica.

30 Finalmente, en otra realización particular, el estado inflamatorio es choque séptico. El choque séptico se define como la presencia de sepsis e hipotensión refractaria, es decir, tensión arterial sistólica menor de 90 mmHg, tensión arterial media menor de 65 mmHg, o una disminución de 40 mmHg en la tensión arterial sistólica en comparación con el nivel inicial que no responde a una exposición a fluido cristalino de 20 a 40 ml/kg. Por tanto, el choque séptico es efectivamente una forma de sepsis grave.

35 La fuente de la infección puede ser cualquiera de varios lugares por todo el cuerpo. Sitios de infección comunes que pueden conducir a sepsis comprenden los siguientes:

40 - inflamación del apéndice (apendicitis), diverticulitis, problemas intestinales, infección de la cavidad abdominal (peritonitis) e infecciones de la vesícula biliar o el hígado;

- inflamación o infecciones del cerebro o la médula espinal;

45 - infecciones del pulmón tales como neumonía;

- infecciones de la piel a través de heridas o a través de incisiones realizadas con catéteres intravenosos, celulitis (inflamación del tejido conjuntivo de la piel);

50 - infecciones de las vías urinarias, especialmente si el paciente tiene un catéter urinario para drenar la orina;

- exámenes o tratamientos dentales y ginecológicos;

- traumatismo romo o penetrante, cirugía y endocarditis.

#### 55 Definición de producto de CD6

El receptor CD6 es una glicoproteína de superficie específica de linaje linfocítico expresada en la membrana de timocitos, células T maduras y el subconjunto de células B B1a, aunque también se ha notificado la expresión de CD6 en determinadas regiones del cerebro. El receptor CD6 pertenece a la superfamilia de SRCR caracterizada por la presencia de una o varias repeticiones de un dominio extracelular rico en cisteína denominado SRCR (véase M.R. Sarrías *et al.*, "The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system", Crit. Rev. Immunol. 2004, vol. 24, págs. 1-37). Su región extracelular está compuesta exclusivamente por tres dominios SRCR consecutivos. Funcionalmente, está asociado físicamente con el complejo de receptor específico de antígeno presente en células T (TCR/CD3) y B (BCR), en donde CD6 contribuye a la modulación o bien positiva o bien negativa de las señales de diferenciación y activación suministradas por el complejo de receptor. Está ampliamente aceptado que CD6 se une a su ligando natural ALCAM ("molécula de

adhesión celular de leucocitos activados”, también conocida como CD166) (véase M.A. Bowen *et al.*, “Analysis of domain-domain interactions between CD6 and activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)”, *Tissue Antigens* 1996, vol. 48, págs. AS401.32), una molécula de adhesión ampliamente expresada de la superfamilia de Ig.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “producto de CD6” significa un producto que comprende el ectodominio de CD6 o un fragmento del mismo. Ectodominio se refiere a los tres dominios SRCR con las secuencias intermedias y la región de tallo que lo separa de la membrana. Los productos de CD6 adecuados incluyen polipéptido natural, sintético o recombinante biológicamente activo de ectodominio de CD6 o fragmentos del mismo; variantes de polipéptido biológicamente activas de ectodominio de CD6 o fragmentos del mismo, incluyendo  
10 proteínas de fusión híbridas o dímeros.

El producto de CD6 es de origen de mamífero y más preferiblemente de origen humano.

15 CD6 humano tiene de 100 a 130 kDa. La proteína CD6 de longitud completa humana descrita en el número de registro de GenBank NP\_006716 tiene 668 aminoácidos. El ectodominio está compuesto por tres dominios SRCR, las secuencias intermedias y una región de tallo.

En una realización particular, el producto de CD6 de la invención comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Esta secuencia incluye los tres dominios SRCR, las secuencias intermedias y la región de tallo. En otra  
20 realización, el producto de CD6 es un producto de CD6 murino.

Debido a los bajos niveles en plasma de CD6, no es viable desde el punto de vista industrial obtener CD6 a partir de la purificación de plasma o suero. Por tanto, con el propósito de la invención, se prefiere producir el producto de CD6 mediante métodos de ingeniería genética. Cualquier método usado comúnmente en la técnica puede emplearse  
25 para producir CD6 recombinante, denominado a continuación en el presente documento rCD6. Un método preferido para expresar y purificar rCD6 se describe más adelante en los ejemplos. Este método permite producir rCD6 para propósitos experimentales, de modo que es necesario la ampliación a escala industrial para producir grandes cantidades de rCD6. El CD6 de la presente invención también puede expresarse como una proteína de fusión.

30 Para someter a prueba si un producto de CD6 es adecuado para el propósito de la invención, puede usarse un ensayo de unión microbiano. En el ejemplo 1 se describe un ensayo adecuado.

Según las enseñanzas de la presente invención, el producto de CD6 puede administrarse a un mamífero, preferiblemente un humano. El propósito de la administración del producto de CD6 puede ser preventivo (evitar el desarrollo de estas enfermedades) y/o terapéutico (tratar estas enfermedades una vez que se han desarrollado/instalado).  
35

Debe entenderse que el producto de CD6 se administra en una forma farmacéuticamente aceptable. Los expertos en la técnica pueden determinar la dosis apropiada usando procedimientos convencionales. Se entiende que la dosis debe ser una cantidad eficaz de producto de CD6 en el sentido de que se observe una respuesta inflamatoria reducida en el sujeto tratado.  
40

El producto de CD6 de la invención puede administrarse solo o en una composición con portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. El experto en la técnica adaptará la composición dependiendo del modo de administración particular. Las composiciones pueden comprender el producto de CD6 como un único agente contra las enfermedades infecciosas o los estados inflamatorios relacionados con las mismas, combinaciones de tales agentes o combinaciones con otros agentes terapéuticos dependiendo del estado.  
45

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica de la presente invención. A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones, el término “comprender” y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden ser limitativos de la presente invención.  
50  
55

En los ejemplos y dibujos, rsCD6 se refiere al ectodominio de CD6 soluble obtenido de manera recombinante para distinguirlo del receptor CD6 unido a la membrana.  
60

### Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la unión de de rsCD6 a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. A) Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de las proteínas marcadas con biotina purificadas por afinidad con estreptavidina-HRP. B) Unión de proteínas biotiniladas (BSA, rsCD5, rSpα y rsCD6) a *E. coli* y *S. aureus*. C) Dependencia con el calcio de la unión de rsCD6 y rSpα marcados con biotina a *E. coli* y *S. aureus*. TPA significa  
65

“proteína total añadida”. D) Ensayos de unión competitiva de rsCD6-biotina a *E. coli* y *S. aureus* en presencia de concentraciones crecientes de LPS o LTA. C significa “competidor”.

5 La figura 2 muestra la caracterización de CD6 circulante purificado por afinidad a partir de suero humano. A) Tinción con azul de Coomassie de nsCD6 purificado por afinidad a partir de suero humano. B) Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de proteínas nsCD6 y rsCD6 purificadas marcadas con biotina y CD6 de membrana inmunoprecipitada a partir de células T HUT-78 biotiniladas de superficie con estreptavidina-HRP. C) Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de las mismas proteínas marcadas con biotina que en B) con un antisuero policlonal de conejo específico para la región extracelular de CD6. D) Análisis de citometría de flujo de la reactividad de rsCD5, rsCD6, nsCD6 o BSA marcados con biotina con las células K652 y Raji. Se detectó la proteína unida con estreptavidina-Tricolor. F.I. significa “intensidad de fluorescencia” y C.N. significa “número de células”.

15 La figura 3 se refiere a la unión de rsCD6 a LPS. A) ELISA que muestra la unión directa de nsCD6 y rsCD6 purificados por afinidad a LPS. Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con LPS purificado a partir de *E. coli*. Entonces se añadieron a los pocillos varias concentraciones de rsCD6, nsCD6 o BSA marcado con biotina, y se detectó la proteína unida con estreptavidina-HRP. Entonces se monitorizó la unión de rsCD6 o rsCD5 a Re-LPS mediante cambios en las propiedades de fluorescencia de FITC-Re-LPS. P.a. significa “proteína añadida”. B) rsCD6, pero no rsCD5, induce un aumento significativo en la anisotropía de fluorescencia (denominada “A”) tras la unión a FITC-Re-LPS, que aumenta con la concentración creciente de rsCD6. C) Cambio neto en la intensidad de emisión de fluorescencia (denominada “F”) de FITC-Re-LPS a 520 nm tras la adición de cantidades crecientes de rsCD6 o rsCD5. La Kd aparente para complejos de FITC-Re-LPS/rsCD6, calculada a partir de la curva de saturación ajustada a una hipérbola rectangular, era de  $2,69 \pm 0,32 \times 10^{-8}$  M.

25 La figura 4 muestra la unión de LPS de *E. coli* a CD6 de superficie celular. A) Análisis de citometría de flujo que muestra la unión directa de cantidades crecientes de LPS-FITC (0, 10, 20  $\mu$ g) a células 2G5 parentales y transfectadas con CD6.wt. C.N. significa “número de células” y F.I. “intensidad de fluorescencia”. B) Para facilitar la comparación, se representaron gráficamente las intensidades de fluorescencia medias de A) frente a la cantidad de LPS-FITC añadida a cada línea celular. G.M. significa “media geométrica”. C) Estudios de competencia de la unión de LPS-FITC a los transfectantes 2G5-CD6.wt. Se incubaron las células con 15  $\mu$ g de FITC-LPS en presencia de cantidades crecientes (0, 10, 20  $\mu$ g) de rsCD6 (parte izquierda) o con 15  $\mu$ g de o bien rsCD6 o bien rsCD5 (parte derecha). Se analizó la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo.

35 La figura 5 muestra que rsCD6 induce agregación bacteriana. A) Se incubaron suspensiones bacterianas de *E. coli* y *S. aureus* marcadas con FITC durante la noche a temperatura ambiente (TA) con rsCD6 o rsCD5 (2  $\mu$ M) en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  5 mM. Se usaron concentraciones equimolares de rSp $\alpha$  y HSA como control positivo y negativo, respectivamente. Se observó la agregación mediante examen directo en un microscopio de fluorescencia. B) Cinética de la agregación de Re-LPS dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia (●) y presencia de concentración creciente de rsCD6. Las concentraciones finales de Re-LPS, calcio y EDTA eran de 100  $\mu$ g/ml, 2,5 mM y 5 mM, respectivamente. Las concentraciones finales de rsCD6 eran de 0,25 (○), 0,50 (△), 1,0 (●), 2,0 (□)  $\mu$ g/ml. Se muestra un experimento representativo de dos realizados. Se indica el tiempo como T (min).

45 La figura 6 muestra el efecto de rsCD6 y rsCD5 sobre la tasa de supervivencia y los niveles en suero de citocinas tras el choque séptico inducido por LPS. A) Gráfico de supervivencia (S). Se les inyectó a ratones C57BL/6J (de 8 semanas de edad) por vía i.p. una dosis letal de LPS de *E. coli* 0111:B4 (30 mg/kg) 1 h tras la administración i.p. de o bien solución salina estéril (denominada “S”) (n = 26) o bien rsCD5 (n = 10) o bien rsCD6 (n = 16) (25  $\mu$ g, cada uno). Se analizó el porcentaje de supervivencia de los ratones usando Gradpath prism 4.0 y se calcularon los valores de P de la prueba de la t de rangos logarítmicos. B) Niveles de citocinas circulantes en ratones expuestos a LPS. Se cuantificaron los niveles en plasma de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 mediante ELISA a diferentes tiempos tras la inyección de LPS. Se expresan los datos como la media  $\pm$  EEM. Se evaluaron las diferencias estadísticas en los resultados mediante la prueba de la t de Student de dos colas. \*, Diferencia estadísticamente significativa (P<0,05). Se indica el tiempo como T (min).

55 La figura 7 muestra la unión de rsCD6 a zimosano extraído de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Los resultados del ensayo ELISA en el que A significa “absorbancia”, Z “zimosano” y P “peptidoglucano” purificado a partir de *S. aureus*. LPS purificado a partir de la cepa de *E. coli* 0111:B4 y BSA son los controles positivo y negativo.

La figura 8 muestra la unión de rsCD6 que se une a partículas de citomegalovirus humano. Resultados del ensayo ELISA.

60 La figura 9 muestra la unión de rsCD6 que se une a la proteína de superficie de VIH gp120. Resultados del ensayo ELISA.

#### Descripción detallada de realizaciones particulares

65 Células

Se obtuvieron la línea de células B linfoblastoides humanas Raji, la línea de células eritromieloides K562, así como la línea de células T leucémicas HUT-78 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA). Se obtuvieron células Jurkat 2G5 negativas para CD5 y CD6 mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y clonación adicional de células Jurkat, tal como se notifica (M. Simarro *et al.*, "The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent and -independent diacylglycerol production", *J. Immunol.* 1997, vol. 159, págs. 4307-4315). Se transfectaron de manera estable las células Jurkat 2G5 con el constructo pH<sup>β</sup>-CD6.wt. En resumen, se obtuvo el constructo de expresión que codifica para CD6 de tipo natural (pH<sup>β</sup>-CD6.wt) clonando fragmentos sometidos a restricción con Sall/EcoRI y EcoRI/BamHI (Fermentas MBI) correspondientes a las regiones extracelular y citoplasmática de CD6, respectivamente, en el vector de expresión de mamífero pH<sup>β</sup>APr-1-neo sometido a restricción con Sall/BamHI. Se obtuvo la porción extracelular de CD6 mediante amplificación por PCR usando los cebadores 5'TCTCGTGCACATGTGGCTCTTCTCGGGAT3' (SEQ ID NO: 2) y 5'AACTTCTTTGGGGATGGTGATGGG3' (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de ADNc de CD6-PB1 clonada en pBneo como molde. Se obtuvo la región intracelular de CD6 mediante amplificación por PCR de ADNc de HUT78 con los cebadores 5'GTCACATAGAACTTCTGTG3' (SEQ ID NO: 4) y 5'AAAGGATCCCTAGGCTGCGCTGATGTATC3' (SEQ ID NO: 5) (véase I. Gimferrer *et al.*, "The accessory molecules CD5 and CD6 associate on the membrane of lymphoid T cells", *J. Biol. Chem.* 2003, vol. 278, págs. 8564-71).

A menos que se indique, todas las células usadas en este estudio se hicieron crecer en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) complementado con penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml y FCS al 10% (GIBCO Invitrogen, Paisley, R.U.). Se hizo crecer la línea de células epiteliales de riñón embrionario humano HEK 293-EBNA (Invitrogen Life Technologies, Paisley, R.U.) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM/F12; Invitrogen Life Technologies), complementado con penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml, geneticina 250 µg/ml (G418) y FCS al 10%.

#### Anticuerpos y reactivos

Los AcM Cris-1 (anti-CD5, IgG2a) y 161.8 (anti-CD6, IgG1) los produjo el Dr. R. Vilella (Hospital Clinic, Barcelona, España). Los AcM de ratón anti-CD6 humano MAE1-C10 (IgG1) y SPV-L14.2 (IgG1) los proporcionaron los Drs. F. Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, España) (véase L. Cardenas *et al.*, "Phosphorylation-Dephosphorylation of the CD6 Glycoprotein Renders 2 Isoforms of 130 and 105 Kilodaltons - Effect of Serum and Protein-Kinase-C Activators" *Journal of Immunology* 1990, vol. 145, págs. 1450-55) y Jo Hilders (Bioprobe B.V., Países Bajos), respectivamente. El antisuero policlonal de conejo contra la región extracelular de CD6 humano se produjo en el laboratorio mediante inmunización con rsCD6 (véase I. Gimferrer *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2003, vol. 278, págs. 8564-71).

Se adquirieron los siguientes reactivos: estreptavidina conjugada con HRP (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca); anticuerpo de conejo anti-Ig de ratón conjugado con FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.); LPS purificado a partir de *E. coli* (O55:B5, O26:B6, O111:B4) y ácido lipoteicoico (LTA) de *S. aureus*, así como FITC-LPS de *E. coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich). PBS (Roche Diagnostics, Indianápolis, EE.UU.) es NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7,4; TBS es NaCl 140 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. HSA era de Grifols (Grifols, Barcelona, España). El Re-LPS, un mutante Re595 de LPS de *Salmonella minnesota*, era de Sigma. La fluoresceína y el 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC, isómero I) eran de Molecular Probes (Eugene, OR). El metanol y cloroformo usados para disolver Re-LPS eran de calidad para HPLC (Scharlau, Barcelona).

#### Expresión y purificación por afinidad de proteínas solubles recombinantes

Se expresó el ectodominio de CD6 humano (aminoácidos D25 a E384 de rsCD6, numeración de la proteína inmadura) usando un sistema de expresión episómico en células de riñón embrionario humano (HEK 293-EBNA). Estas células expresan de manera constitutiva la proteína del virus de Epstein Barr EBNA-1, que permite la replicación episómica del vector pCEP-Pu, una amable donación de los Drs. T. Sasaki y R. Timpl (Max Planck Institute for Biochemistry, Martinsried, Alemania) (véase E. Kohfeldt *et al.*, "Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican", 1997, *FEBS Lett.* vol. 414, págs. 557-61). Se amplificó por PCR la región extracelular de CD6 usando 5'CTTCTAGATGACCAGCTCAACACCACCAGCA3' (SEQ ID NO: 6) y 5'GCGGATCCCTA TTCTATAGTACTGTCTGAACA3' (SEQ ID NO: 7) y el ADNc de CD6-PB1 como molde (véase W.H. Robinson *et al.*, "Human CD6 possesses a large, alternatively spliced cytoplasmic domain", *Eur. J. Immunol.* 1995, vol. 25, págs. 276). Se clonó el producto de PCR en el vector pCEP-Pu. Se transfectaron los constructos resultantes en células HEK 293-EBNA. En resumen, se transfectaron 10<sup>6</sup> células en placas de cultivo de 10 cm usando el método de fosfato de calcio con 20 µg de los plásmidos. Se seleccionaron transfectantes con puromicina 1 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO) en el medio de cultivo. Se hicieron crecer los transfectantes celulares que expresaban rsCD6 hasta confluencia en DMEM/FCS, se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Roche Diagnostics, Indianápolis, EE.UU.) y se intercambiaron a medio libre de suero (DMEM/F12), que contenía penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml, G418 250 µg/ml y puromicina 1 µg/ml. Se recogió el medio cada 48-72 h a lo largo de un periodo de 15 días. La proteína recombinante se purificó por afinidad sobre una columna de Sepharose 4B activada con CNBr acoplada covalentemente a AcM 168.1 (anti-CD6). Entonces se retiró

la proteína no unida mediante lavado con PBS que contenía NaCl 0,5 M y NP40 al 1%. Se eluyó la proteína con PBS que contenía MgCl<sub>2</sub> 3,5 M, y se dializó frente a PBS. Se evaluó la pureza de la proteína purificada mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras, y tinción con azul de Coomassie.

#### 5 Biotinilación de proteínas

Se realizó la biotinilación de proteínas con biotina activada con EZ-Link-PEO-maleimida (Pierce, Perbio Science, Cheshire, R.U.) siguiendo las instrucciones del fabricante y como anteriormente (véase M.R. Sarrias *et al.*, "A role for human SP alpha as a pattern recognition receptor", J. Biol. Chem. 2005, vol. 280, págs. 35391-8). Se retiró la biotina libre intercambiando las muestras a PBS sobre una columna de desalación HiTrap™ (Amersham Pharmacia Biotech). Se realizó la monitorización de las reacciones de biotinilación mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

#### 15 Cepas bacterianas y estudios de unión bacteriana

Las cepas bacterianas de *E. coli* y *Staphylococcus aureus* usadas en este estudio son aislados clínicos caracterizados por el Departamento de Microbiología del Hospital Clinic de Barcelona usando procedimientos bioquímicos convencionales. Se hicieron crecer las bacterias durante la noche en caldo Luria Bertoni (LB) a 37°C con aireación y luego se recogieron mediante centrifugación a 3500 x g durante 10 min. Se resuspendieron los sedimentos bacterianos en TBS (NaCl 140 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) hasta una densidad final de 10<sup>10</sup> bacterias por ml. Se realizó la cuantificación sembrando en placa diluciones de bacterias sobre agar. Se estudió la unión de rsCD6 a bacterias siguiendo un método descrito anteriormente (véase M.R. Sarrias *et al.*, J. Biol. Chem. 2005, vol. 280, págs. 35391-8).

#### 25 Purificación de CD6 soluble a partir de suero humano

Se obtuvo un litro de plasma humano acumulado de donantes de sangre sanos del Banco de Sangre del Hospital Clinic de Barcelona. Se centrifugó el plasma a 10.000 g durante 15 min y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.). Entonces se precipitó el plasma con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 20% (p/v) a 4°C durante 30 min en presencia de leupeptina y aprotinina 2 mg/ml, PMSF 1 mM, azida de sodio al 0,02% y NP-40 al 0,5%, y luego se centrifugó a 10.000 g durante 30 min a 4°C. Se llevó el sobrenadante resultante a (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 70% (p/v) a 4°C durante 30 min, y luego se centrifugó a 10.000 g durante 30 min a 4°C. Se resuspendió el sedimento en PBS y se sometió a diálisis a 4°C frente a PBS complementado con PMSF 1 mM y azida de sodio al 0,02%. La proteína dializada se purificó por afinidad sobre una columna de Sepharose-4B activada con CNBr (Amersham Pharmacia Biotech) adsorbida con el AcM anti-CD6 SPV-L14.2. Se evaluó la presencia de nsCD6 en las fracciones eluidas mediante ELISA de tipo sándwich con AcM específicos (véase M. Ramos-Casals *et al.*, "High circulating levels of soluble scavenger receptors (sCD5 and sCD6) in patients with primary Sjogren's syndrome" Rheumatology 2001, vol. 40, págs. 1056-9) e inmunotransferencia de tipo Western. Se evaluó la pureza mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.

#### 40 Ensayos ELISA de unión a LPS

Se usaron doce µg de LPS purificado a partir de *E. coli* O55:B5, O111:B4 u O26:B6 (Sigma) para recubrir placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en PBS, durante la noche a 4°C. Se impidió la unión no específica a los pocillos mediante la adición de PBS que contenía BSA al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Entonces se añadieron varias concentraciones de BSA, rsCD6 o nsCD6 marcados con biotina a los pocillos y se incubaron durante 1 h a TA. Se detectó la proteína unida mediante la adición de una dilución 1:1000 de estreptavidina marcada con HRP (DAKO, Glostrup, Dinamarca), incubando durante 30 min a TA. Entre cada etapa de incubación, se retiró la proteína o HRP-estreptavidina no unida mediante lavado tres veces con PBS más Tween-20 al 0,01%. Se desarrolló color añadiendo sustrato líquido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma), y se leyó la absorbancia a 405 nm. Se repitió el ensayo tres veces con resultados similares.

#### Ensayos de unión de proteínas solubles a FITC-Re-LPS

Se preparó un derivado de Re-LPS fluorescente (FITC-Re-LPS) en el que el grupo fosfoetanolamina de Re-LPS se unió a FITC y se preparó mediante un método descrito anteriormente (véase R.R. Skelly *et al.*, "Stimulation of T-independent antibody responses by hapten-lipopolysaccharides without repeating polymeric structure", Infect. Immun. 1979, vol. 23, págs. 287-93). Se llevaron a cabo mediciones de fluorescencia usando un espectrofluorímetro AB-2 de SLM-Aminco con un portacubetas termostaticado (± 0,1°C), usando 5 cubetas de cuarzo de longitud de paso de 5x5 mm. Se midieron los espectros de emisión de fluorescencia de FITC-Re-LPS (0,5 µg/ml) en presencia y ausencia de o bien rsCD6 o bien rsCD5 en NaCl 100 mM, EDTA 2 mM, tampón Tris-HCl 5 mM (pH 8) a 15°C. Los blancos (proteína sola) y las muestras de FITC-Re-LPS (con y sin proteína) se excitaron a 470 nm y se registraron los espectros de emisión desde 500 hasta 650 nm. Se obtuvo la Kd aparente para complejos de FITC-Re-LPS/proteína analizando la dependencia con el tiempo del cambio en la fluorescencia cuando se hizo reaccionar FITC-Re-LPS 0,5 µg/ml con diversas concentraciones de o bien rsCD6 o bien rsCD5 a 15°C. Se monitorizó la



emisión de fluorescencia a 520 nm durante 30 min. Se realizaron estos experimentos dos veces y por duplicado, tal como se describió anteriormente para la determinación de la  $K_d$  de la interacción de Re-LPS con LBP, CD14, proteína A del surfactante y rSp $\alpha$  (véanse M.R. Sarrias *et al.*, J. Biol. Chem. 2005, vol. 280, págs. 35391-8; P.S. Tobias *et al.*, "Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14", J. Biol. Chem. 1995, vol. 270, págs. 10482-8; e I. Garcia-Verdugo *et al.*, "Interaction of SP-A (surfactant protein A) with bacterial rough lipopolysaccharide (Re-LPS), and effects of SP-A on the binding of Re-LPS to CD14 and LPS-binding protein", Biochemical Journal 2005, vol. 391, págs. 115-24).

Se obtuvieron mediciones de anisotropía de emisión de fluorescencia con polarizadores Glan Prism tal como se describió anteriormente (véase I. Garcia-Verdugo *et al.*, Biochemical Journal 2005, vol. 391, págs. 115-24). Las longitudes de onda de excitación y emisión se fijaron a 470 y 520 nm, respectivamente.

#### Ensayos de agregación de bacterias y LPS

Se realizaron los ensayos de agregación de bacterias tal como se describió anteriormente (véase M.R. Sarrias *et al.*, J. Biol. Chem. 2005, vol. 280, págs. 35391-8). Se estudió la agregación de LPS inducida por rsCD6 a 15°C midiendo el cambio en la absorbancia a 400 nm en un espectrofotómetro DU-640 de Beckman tal como se describe (véase I. Garcia-Verdugo *et al.*, Biochemical Journal 2005, vol. 391, págs. 115-24). En resumen, se llenaron en primer lugar las cubetas de muestra y de referencia con Re-LPS (100  $\mu$ g/ml, concentración final) en tampón Tris-HCl 5 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 0,2 mM. Tras un periodo de equilibrado de 10 min a 15°C, se añadió rsCD6 a la cubeta de muestra a la concentración indicada, y se monitorizó el cambio en la absorbancia a 400 nm. A continuación, se añadió Ca<sup>2+</sup> (2,5 mM) a las cubetas tanto de muestra como de referencia, y se monitorizó de nuevo el cambio en la absorbancia. Se revertió la agregación de LPS dependiente de Ca<sup>2+</sup> añadiendo EDTA (5 mM, concentración final).

#### Ensayos de citometría de flujo

Se evaluaron las propiedades de unión a células de proteínas solubles tal como se describió anteriormente (véase J. Calvo *et al.*, "Identification of a natural soluble form of human CD5" Tissue Antigens 1999, vol. 54, págs. 128-37). Se evaluó la unión de LPS a CD6 de superficie celular usando la línea celular 2G5-CD6.wt. En resumen, se incubaron  $2 \times 10^5$  células con diferentes cantidades de LPS-FITC de *E. coli* 0111:B4 (Sigma) en presencia de tampón de bloqueo (PBS más suero AB humano al 10%, FCS al 2% y azida de sodio al 0,02%). Tras 1 h de incubación a 4°C, se lavaron las células dos veces con tampón de lavado (PBS más FCS al 2% y azida de sodio al 0,02%). Para estudios de competencia, se incubaron 15  $\mu$ g de FITC-LPS durante 30 min sobre hielo con  $2 \times 10^5$  células 2G5-CD6.wt en presencia de diferentes cantidades de rsCD5 o rsCD6.

#### Inmunoprecipitación de CD6

Para la inmunoprecipitación de CD6 unido a la superficie celular (mCD6), se marcaron en la superficie  $1 \times 10^6$  células T HUT-78 con biotina activada con EZ-Link-PEO-maleimida (Pierce, Perbio Science, Cheshire, R.U.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Entonces, se solubilizaron las membranas con detergente Triton X-100 y se inmunoprecipitaron las proteínas durante 2 h a 4°C con 1  $\mu$ g de AcM anti-CD6 (161.8) más 20  $\mu$ l de perlas de Sepharose CL-4B con proteína A al 50% (Amersham Biosciences). Se analizaron los complejos inmunitarios mediante inmunotransferencia de tipo Western tal como se describió (véase I. Gimferrer *et al.*, J. Biol. Chem. 2003, vol. 278, págs. 8564-71).

#### Choque endotóxico inducido por LPS

Se les inyectó a ratones C57BL/6J (de 8 semanas de edad) por vía i.p. una dosis letal de LPS de *E. coli* 0111:B4 (Sigma, St. Louis, MO) (30 mg/kg) en un volumen de 250  $\mu$ l de solución salina estéril. Se llevó a cabo la administración de 25  $\mu$ g de o bien rsCD5 (10 ratones) o bien rsCD6 (16 ratones) 1 h antes de la exposición a LPS. Los ratones control recibieron el mismo volumen de solución salina estéril (26 ratones). Se analizó el porcentaje de ratones supervivientes usando Gradpath prism 4.0 y se calcularon los valores de P de la prueba de la t de rangos logarítmicos.

El procedimiento experimental fue aprobado por el comité ético de la Universidad de Murcia y se realizó según las directrices institucionales para el cuidado de animales que cumplen con las regulaciones en España (RD 1201/2005), Europa (86/609) y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los National Institutes of Health.

#### Determinación de los niveles en suero de citocinas

Se determinó la liberación sistémica de las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en muestras de suero acumuladas de 6 ratones de cada grupo mediante ELISA según las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los datos se expresan como la media  $\pm$  EEM. Se evaluaron las diferencias estadísticas en los resultados mediante la prueba de la t de Student de dos colas.

EJEMPLO 1: rsCD6 se une a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas

5 Para determinar si el ectodominio de CD6 humano podía unirse directamente a la superficie de bacterias completas, se usó el enfoque descrito en D.W. Dunne *et al.*, "The Type-I Macrophage Scavenger Receptor Binds to Gram-Positive Bacteria and Recognizes Lipoteichoic Acid", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1994, vol. 91, págs. 1863-7. Por tanto, se incubaron proteínas solubles recombinantes marcadas con biotina que abarcan los ectodominios de CD5, CD6 y Sp $\alpha$  humanos (rsCD5, rsCD6 y rSp $\alpha$ ) (figura 1A) con suspensiones bacterianas y se sometió a ensayo adicionalmente su unión a sedimentos bacterianos mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western frente a estreptavidina-HRP. Los resultados muestran que rsCD6 se unió a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (figura 1B), lo que indica que esta proteína presenta actividad de unión bacteriana. En cambio, ni rsCD5 ni el control negativo BSA se unieron a suspensiones bacterianas. Tal como se ilustra mediante la figura 1C, la presencia de rsCD6 marcado con biotina se redujo enormemente en sedimentos de células bacterianas de *E. coli* y *S. aureus* en presencia de EDTA. Esto indica que rsCD6 media en el reconocimiento dependiente de Ca<sup>2+</sup> de componentes de la pared celular de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

20 Para determinar si la unión observada de rsCD6 a bacterias era específica y para identificar qué estructuras de la superficie de células bacterianas estaban reconociéndose, se diseñaron experimentos de competencia en los que se incubó rsCD6 marcado con biotina con concentraciones crecientes de LPS purificado, o LTA, antes de la adición de una suspensión de o bien *E. coli* o bien *S. aureus* (5 x 10<sup>7</sup> células). Se sometieron a ensayo LPS y LTA porque son componentes ubicuos de la superficie celular de estos microorganismos. Tal como se ilustra mediante la figura 1D, la unión de rsCD6 marcado con biotina a *E. coli* experimentaba competencia de una manera dependiente de la dosis por LPS (de *E. coli*), pero no por LTA (de *S. aureus*). Por el contrario, cuando se estudió la unión de rsCD6 a *S. aureus*, LPS no afectó a tal interacción. De manera interesante, la unión experimentaba competencia de una manera dependiente de la dosis por LTA de *S. aureus*.

EJEMPLO 2: Purificación de nsCD6 a partir de suero humano

30 Se purificó por afinidad sCD6 natural a partir de 1 l de plasma acumulado. Esto produjo 6  $\mu$ g de una única proteína con un peso molecular (PM) de 80 kDa tal como se deduce a partir del análisis de SDS-PAGE y la tinción con azul de Coomassie (figura 2A). El PM observado se asemeja estrechamente al de CD6 soluble recombinante (rsCD6) producido en el laboratorio, que está compuesto exclusivamente por los tres dominios extracelulares SRCR de CD6, y está en contraposición al de la forma de membrana de CD6 (mCD6), que oscila entre 105 y 130 kDa, dependiendo de su grado de fosforilación. En la figura 2B, se muestra el PM observado de las tres formas de CD6 diferentes, es decir rsCD6, nsCD6 y mCD6 inmunoprecipitadas a partir de células T HUT-78 humanas. La proteína nsCD6 purificada se identificó como CD6 mediante ensayos de inmunotransferencia de tipo Western con un antisuero policlonal generado contra la región extracelular de CD6 humano (figura 2C). En experimentos de unión celular, tanto rsCD6 como nsCD6 marcados con biotina se unieron a células B Raji pero no a células eritroleucémicas K562, según la expresión diferencial del ligando de CD6 (ALCAM/CD166) (figura 2D).

EJEMPLO 3: Unión de rsCD6 a LPS y cinética de la interacción rsCD6-LPS

45 Se obtuvo la confirmación adicional de la interacción rsCD6-LPS a partir de ensayos ELISA de unión directa en los que se recubrieron placas con LPS purificado a partir de tres cepas de *E. coli* diferentes (O55:B5, O111:B4 u O26:B6), y se sometieron a ensayo para detectar la unión de rsCD6, nsCD6 o BSA marcado con biotina. Los resultados presentados en la figura 3A muestran que, según los experimentos de unión bacteriana en la figura 1, las formas de CD6 soluble tanto natural como recombinante se unieron a LPS de un modo dependiente de la dosis. No pudo observarse interacción BSA-LPS.

50 Se estudió a continuación la unión de rsCD6 y rsCD5 a un mutante rugoso (Re595) de LPS (Re-LPS) en disolución analizando los cambios en las propiedades de fluorescencia de FITC-Re-LPS tales como anisotropía e intensidad. La figura 3B muestra la unión de rsCD6 y rsCD5 a FITC-Re-LPS midiendo la anisotropía de fluorescencia de la molécula de LPS marcada. Las mediciones de anisotropía de fluorescencia dependen de la velocidad y magnitud del movimiento de rotación del fluoróforo durante la duración del estado excitado. La adición de diferentes cantidades de rsCD6 a FITC-Re-LPS provocó un aumento dependiente de la concentración de proteína de los valores de anisotropía de FITC-Re-LPS, lo que indica que la unión de rsCD6 a Re-LPS provocó restricciones mecánicas de la movilidad rotacional del colorante. Se realizaron experimentos de control con fluoresceína libre para demostrar que todos estos cambios no resultaban de la interacción de rsCD6 con el colorante (fluoresceína), sino con la molécula de LPS (datos no mostrados). La anisotropía de emisión de fluorescencia de la fluoresceína libre era muy baja y no se vio afectada por la adición de un exceso de 3 veces de rsCD6 (datos no mostrados). Por otro lado, rsCD5 no provocó ningún cambio en la anisotropía de fluorescencia de FITC-Re-LPS, lo que indica que esta proteína no se une a Re-LPS.

65 La adición de rsCD6, pero no de rsCD5, a FITC-Re-LPS en disolución también produjo un aumento de la intensidad de emisión de fluorescencia total de LPS fluorescente. Se determinó la dependencia con el tiempo del cambio en la

intensidad de emisión de fluorescencia a 520 nm cuando se hizo reaccionar FITC-Re-LPS con cantidades crecientes de o bien rsCD6 o bien rsCD5. La figura 3C muestra que la magnitud del cambio en la intensidad de fluorescencia aumentó en función de la concentración de rsCD6, pero no de la concentración de rsCD5, y era saturable. Estos resultados permitieron determinar la afinidad de la unión de rsCD6 a LPS. La Kd aparente para complejos de FITC-Re-LPS/rsCD6, calculada a partir de la curva de saturación ajustada a una hipérbola rectangular, era de 2,69 ( $\pm 0,32$ )  $10^{-8}$  M.

EJEMPLO 4: Unión de LPS a CD6 de superficie celular

Para determinar si la interacción LPS-CD6 se produce también con el receptor expresado en la superficie celular, se realizaron estudios mediante tinción con LPS marcado con FITC de células 2G5, un derivado de células Jurkat seleccionadas por su expresión deficiente de CD5 y CD6. Tal como se muestra mediante los estudios de citometría de flujo presentados en las figuras 4A y 4B, la intensidad de fluorescencia era mayor en células 2G5 que expresaban de manera estable CD6 de tipo natural (2G5-CD6.wt) en comparación con células 2G5 parentales no transfectadas. Se obtuvo la confirmación adicional de estos resultados a partir de experimentos de unión competitiva. Se tiñeron células 2G5-CD6.wt con una única cantidad de FITC-LPS en presencia de cantidades crecientes de rsCD6. En estos experimentos, se inhibió la unión de FITC-LPS a células 2G5-CD6.wt de una manera dependiente de la dosis por rsCD6, pero no con rsCD5, usado como control negativo (figura 4C), lo que indica que la inhibición era específica. A partir de estos datos, se concluye que LPS puede interactuar con CD6 en la superficie celular.

EJEMPLO 5: La unión de rsCD6 conduce a agregación tanto de bacterias como de LPS

La figura 5A muestra que la presencia de rsCD6 indujo la agregación de bacterias Gram-negativas (*E. coli*) así como Gram-positivas (*S. aureus*). De acuerdo con su incapacidad para unirse a bacterias, rsCD5 no pudo inducir su agregación, como tampoco el control negativo HSA.

Puesto que la unión de rsCD6 a bacterias Gram-negativas completas se potenció por la presencia de  $Ca^{2+}$  en el tampón de unión (véase la figura 1), se exploró adicionalmente el proceso de agregación de Re-LPS inducido por rsCD6 en presencia de  $Ca^{2+}$ . Se analizó esto midiendo los cambios en la absorbancia de luz a 400 nm (figura 5B). Se llevaron a cabo estos experimentos en las mismas condiciones iónicas que los estudios de unión con LPS fluorescente, excepto porque eran necesarios  $Ca^{2+}$  así como concentraciones de Re-LPS 200 veces mayores para producir absorción de luz detectable a 400 nm. La figura 5B muestra que las moléculas de LPS podían agregarse en tampones que contenían  $Ca^{2+}$  y que bajas concentraciones de rsCD6 inducían una agregación adicional de LPS. Conjuntamente, estos datos sugieren que, en presencia de  $Ca^{2+}$ , rsCD6 puede contribuir al aumento del tamaño de los agregados bacterianos así como de LPS.

EJEMPLO 6: rsCD6 previene el choque séptico inducido por LPS en ratones

Los datos de la figura 5 conducen a la noción de que CD6 circulante (nsCD6) puede contribuir a la eliminación de partículas de LPS, reduciendo su efecto inflamatorio. El aumento de la cantidad de rsCD6 circulante podría tener por tanto un efecto protector en situaciones en las que un exceso de LPS podría ser letal. Para someter a prueba esto, se evaluó si la administración del rsCD6 a ratones mejoraría su supervivencia tras el choque séptico inducido por LPS. Tal como se observa en la figura 6A, la administración de una única dosis i.p. de 25  $\mu$ g de rsCD6, pero no de rsCD5, a ratones una hora antes de la exposición a LPS por vía i.p. potenció significativamente su tasa de supervivencia en comparación con el control de solución salina (hasta el 70%). Según estos datos, la administración de rsCD6 indujo una reducción significativa de los niveles de las citocinas proinflamatorias en plasma TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en estos ratones (figura 6B).

EJEMPLO 7: rsCD6 se une a zimosano extraído de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

Se usaron doce  $\mu$ g de LPS purificado a partir de *E. coli* 0111:B4 (Sigma), zimosano de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma), peptidoglucano purificado a partir de *S. aureus* (Fluka) o albúmina sérica bovina (BSA) para recubrir placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en PBS, durante la noche a 4°C. Se impidió la unión no específica a los pocillos mediante la adición de PBS que contenía BSA al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Entonces se añadieron varias concentraciones de rsCD6 a los pocillos y se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente. Se detectó la proteína unida mediante la adición de una dilución 1:200 de AcM anti-CD6 marcado con biotina (MAE) durante 1 h a TA, seguido por una dilución 1:1000 de estreptavidina marcada con HRP (DAKO, Glostrup, Dinamarca), que se incubó durante 30 min a TA. Entre cada etapa de incubación, se retiró la proteína o HRP-estreptavidina no unida mediante lavado tres veces con PBS más Tween-20 al 0,01%. Se desarrolló color añadiendo sustrato líquido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma), y se leyó la absorbancia a 405 nm. Se repitió el ensayo tres veces con resultados similares.

Los resultados presentados en la figura 7 muestran que rsCD6 se unió a zimosano, peptidoglucano y LPS de un modo dependiente de la dosis. No pudo observarse interacción BSA-rsCD6. Este experimento de ELISA indica que el peptidoglucano, una estructura altamente abundante de la superficie de bacterias Gram-positivas, también se reconoce por rsCD6. De manera interesante, rsCD6 también puede unirse a zimosano de levadura.

EJEMPLO 8: rsCD6 se une a partículas de citomegalovirus humano

5 Se usó un microgramo de un anticuerpo policlonal anti-CMV (BiosPacific, Emeryville, CA, EE.UU.) para recubrir  
placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en PBS, durante la noche a 4°C. Se impidió la  
unión no específica a los pocillos mediante la adición de PBS que contenía BSA al 3% durante 1 h a TA. Entonces  
se añadió un microgramo de una suspensión de partículas de CMV (ABI Advanced Biotechnologies, Maryland,  
EE.UU.) a los pocillos y se incubó durante 1 h a TA. Entonces, se añadieron diferentes concentraciones de proteína  
10 rsCD6 a los pocillos y se incubaron durante 3 h a TA. Se detectó la proteína unida mediante la adición de una  
dilución 1:200 de AcM anti-CD6 marcado con biotina (MAE) durante 1 h a TA, seguido por una dilución 1:1000 de  
estreptavidina marcada con HRP (DAKO, Glostrup, Dinamarca), que se incubó durante 30 min a TA. Entre cada  
etapa de incubación, se retiró la proteína o HRP-estreptavidina no unida mediante lavado tres veces con PBS más  
Tween-20 al 0,01%. Se desarrolló color añadiendo sustrato líquido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma), y se leyó  
15 la absorbancia a 405 nm. Se repitió el ensayo tres veces con resultados similares.

Los resultados presentados en la figura 8 muestran que rsCD6 se unió a partículas de CMV de un modo  
dependiente de la dosis. Se restó la unión no específica de fondo de CD6 a pocillos recubiertos con anticuerpo.  
Estos resultados sugieren que rsCD6 puede unirse a la superficie de citomegalovirus humano.

20 EJEMPLO 9: rsCD6 se une a la proteína de superficie de VIH gp120

Se usaron 100 µl de sobrenadante de cultivo libre de suero de transfectantes celulares que expresan rsCD6 para  
recubrir placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca), durante la noche a 4°C. Se impidió la unión no  
específica a los pocillos mediante la adición de PBS que contenía BSA al 3% durante 1 h a TA. Entonces, se  
añadieron diferentes concentraciones de proteína gp120 recombinante de VIH (Immunodiagnosics, a través del NIH  
25 AIDS Research and Reference Reagent Program, Germantown, Maryland, EE.UU.) a los pocillos y se incubaron  
durante 1 h a TA. Se detectó la proteína unida mediante la adición de 500 ng de un AcM anti-gp120 (Ac hm 2G12,  
Immunodiagnosics) en suero humano inactivado por calor al 2% durante 1 h a TA, seguido por una dilución 1:200  
de anticuerpo anti-IgG humana marcado con HRP (DAKO, Glostrup, Dinamarca), que se incubó durante 30 min a  
30 TA. Entre cada etapa de incubación, se retiró la proteína o HRP-estreptavidina no unida mediante lavado tres veces  
con PBS más Tween-20 al 0,01%. Se desarrolló color añadiendo sustrato líquido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina  
(Sigma), y se leyó la absorbancia a 405 nm. Se repitió el ensayo tres veces con resultados similares.

Los resultados presentados en la figura 9 muestran que rgp120 se unió a rsCD6 de un modo dependiente de la  
35 dosis. Se restó la unión no específica de fondo de rsgp120 al tampón de bloqueo en los pocillos. Estos resultados  
sugieren que rsCD6 puede unirse a rgp120, la proteína externa principal del virus de la inmunodeficiencia humana.

**Lista de secuencias**

40 <110> Universidad de Barcelona

<120> Producto de proteína para el tratamiento de enfermedades infecciosas y de estados inflamatorios  
relacionados con las mismas

45 <130> WO AVCRI012

<150> Documento ES200700893

<151> 28-03-2007

50 <160> 7

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

55 <211> 360

<212> PRT

<213> *Homo sapiens* (fragmento)

<400> 1

ES 2 550 389 T3

Asp Gln Leu Asn Thr Ser Ser Ala Glu Ser Glu Leu Trp Glu Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Leu Pro Val Arg Leu Thr Asn Gly Ser Ser Ser Cys Ser Gly  
 20 25 30  
 Thr Val Glu Val Arg Leu Glu Ala Ser Trp Glu Pro Ala Cys Gly Ala  
 35 40 45  
 Leu Trp Asp Ser Arg Ala Ala Glu Ala Val Cys Arg Ala Leu Gly Cys  
 50 55 60  
 Gly Gly Ala Glu Ala Ala Ser Gln Leu Ala Pro Pro Thr Pro Glu Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Pro Pro Pro Ala Ala Gly Asn Thr Ser Val Ala Ala Asn Ala Thr  
 85 90 95  
 Leu Ala Gly Ala Pro Ala Leu Leu Cys Ser Gly Ala Glu Trp Arg Leu  
 100 105 110  
 Cys Glu Val Val Glu His Ala Cys Arg Ser Asp Gly Arg Arg Ala Arg  
 115 120 125  
 Val Thr Cys Ala Glu Asn Arg Ala Leu Arg Leu Val Asp Gly Gly Gly  
 130 135 140  
 Ala Cys Ala Gly Arg Val Glu Met Leu Glu His Gly Glu Trp Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Val Cys Asp Asp Thr Trp Asp Leu Glu Asp Ala His Val Val Cys Arg  
 165 170 175  
 Gln Leu Gly Cys Gly Trp Ala Val Gln Ala Leu Pro Gly Leu His Phe  
 180 185 190

ES 2 550 389 T3

Thr Pro Gly Arg Gly Pro Ile His Arg Asp Gln Val Asn Cys Ser Gly  
 195 200 205

Ala Glu Ala Tyr Leu Trp Asp Cys Pro Gly Leu Pro Gly Gln His Tyr  
 210 215 220

Cys Gly His Lys Glu Asp Ala Gly Val Val Cys Ser Glu His Gln Ser  
 225 230 235 240

Trp Arg Leu Thr Gly Gly Ala Asp Arg Cys Glu Gly Gln Val Glu Val  
 245 250 255

His Phe Arg Gly Val Trp Asn Thr Val Cys Asp Ser Glu Trp Tyr Pro  
 260 265 270

Ser Glu Ala Lys Val Leu Cys Gln Ser Leu Gly Cys Gly Thr Ala Val  
 275 280 285

Glu Arg Pro Lys Gly Leu Pro His Ser Leu Ser Gly Arg Met Tyr Tyr  
 290 295 300

Ser Cys Asn Gly Glu Glu Leu Thr Leu Ser Asn Cys Ser Trp Arg Phe  
 305 310 315 320

Asn Asn Ser Asn Leu Cys Ser Gln Ser Leu Ala Ala Arg Val Leu Cys  
 325 330 335

Ser Ala Ser Arg Ser Leu His Asn Leu Ser Thr Pro Glu Val Pro Ala  
 340 345 350

Ser Val Gln Thr Val Thr Ile Glu  
 355 360

<210> 2  
 <211> 30  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador de PCR

<400> 2  
 tctcgtcgac atgtggctct tcttcgggat

30

<210> 3  
 15 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador de PCR

<400> 3  
 aacttctttg gggatggtga tggg

24

<210> 4  
 25 <211> 21  
 <212> ADN

ES 2 550 389 T3

<213> Artificial  
<220>  
<223> cebador de PCR  
5  
<400> 4  
gtcactatag aatcttctgt g 21  
<210> 5  
10 <211> 30  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
15 <223> cebador de PCR  
<400> 5  
aaaggatccc taggctgcg tgatgtcatc 30  
<210> 6  
20 <211> 31  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
25 <223> cebador de PCR  
<400> 6  
30 ctcttagatg accagtcaa caccaccagc a 31  
<210> 7  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Artificial  
35 <220>  
<223> cebador de PCR  
<400> 7  
40 gcggatccct attctatagt gactgtctga aca 33

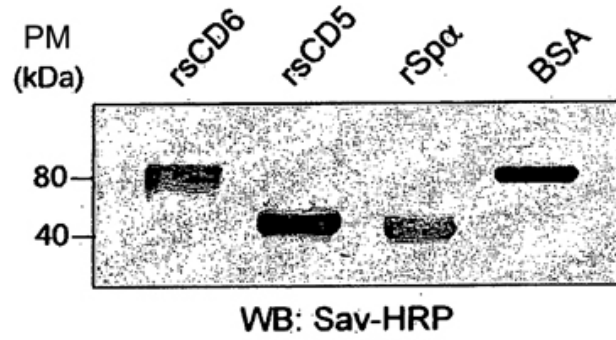
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Producto de CD6 para su uso en un método de tratamiento terapéutico y/o preventivo, en un mamífero incluyendo un humano, de una enfermedad infecciosa, o de un estado inflamatorio relacionado con una enfermedad infecciosa, o de una enfermedad inflamatoria relacionada con la presencia de un producto derivado de un agente infeccioso.
- 10 2. Producto de CD6 para su uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad infecciosa es una infección microbiana.
3. Producto de CD6 para su uso según la reivindicación 2, en el que la infección microbiana se selecciona del grupo que consiste en una infección bacteriana, una infección parasitaria, una infección viral, una infección fúngica y combinaciones de las mismas.
- 15 4. Producto de CD6 para su uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad infecciosa es una septicemia.
- 20 5. Producto de CD6 para su uso según la reivindicación 4, en el que la septicemia se selecciona del grupo que consiste en una bacteriemia, una viremia, una fungemia, una parasitemia y combinaciones de las mismas.
6. Producto de CD6 para su uso según la reivindicación 1, en el que el agente infeccioso se selecciona del grupo que consiste en una bacteria, un parásito, un virus, un hongo, y combinaciones de los mismos.
- 25 7. Producto de CD6 para su uso según la reivindicación 1, en el que el estado inflamatorio es síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.
8. Producto de CD6 para su uso según la reivindicación 1, en el que el estado inflamatorio es sepsis.
- 30 9. Producto de CD6 para su uso según la reivindicación 8, en el que la sepsis es sepsis grave.
10. Producto de CD6 para su uso según la reivindicación 9, en el que la sepsis grave es choque séptico.
- 35 11. Producto de CD6 para su uso según la reivindicación 10, en el que el choque séptico es choque séptico inducido por endotoxinas.
12. Producto de CD6 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que es un CD6 recombinante.
13. Producto de CD6 para su uso según la reivindicación 12, que es un producto de CD6 humano.
- 40 14. Producto de CD6 para su uso según la reivindicación 13, que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

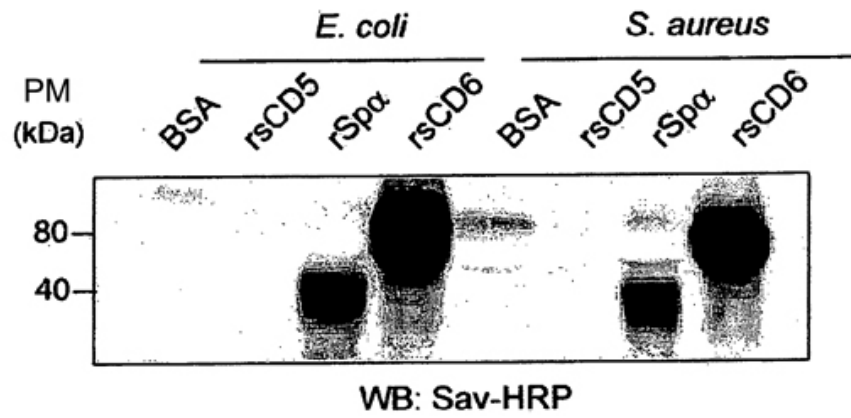


# FIG. 1

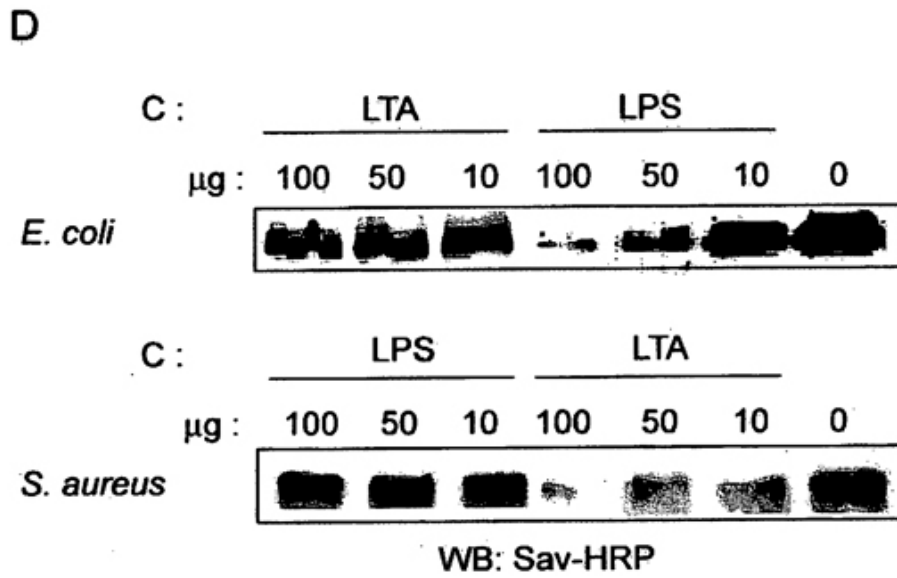
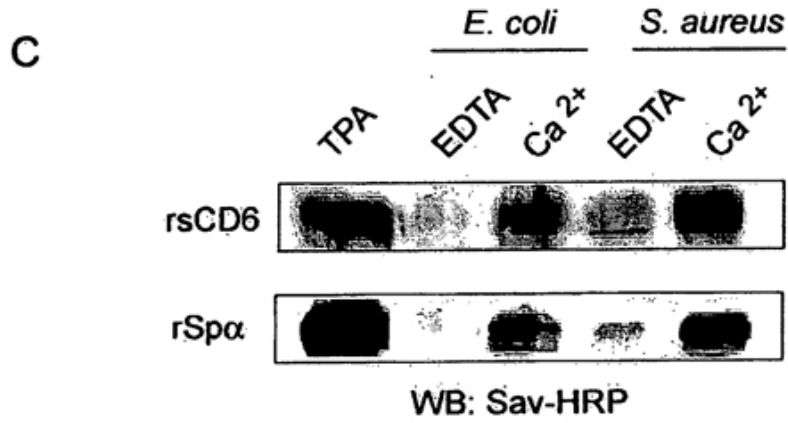
A



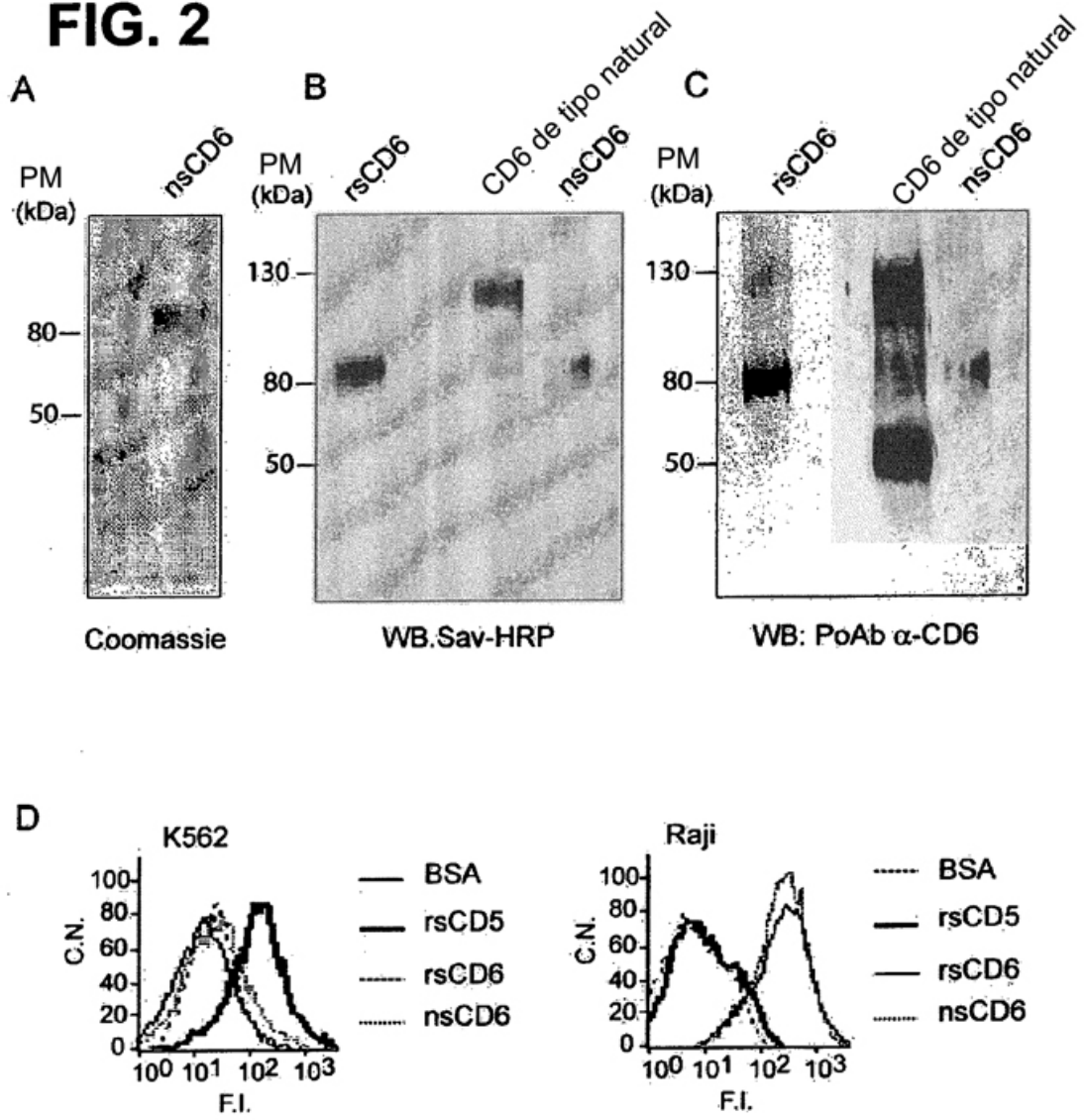
B



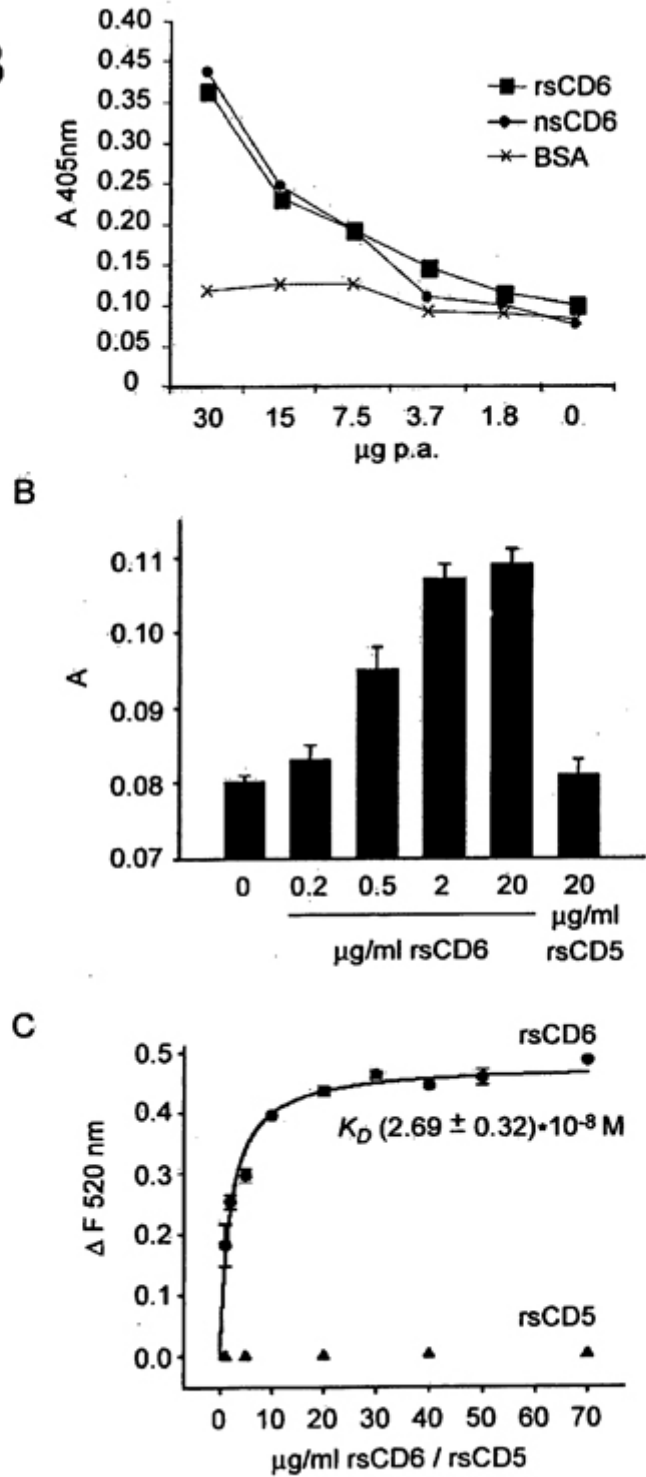
**FIG. 1**



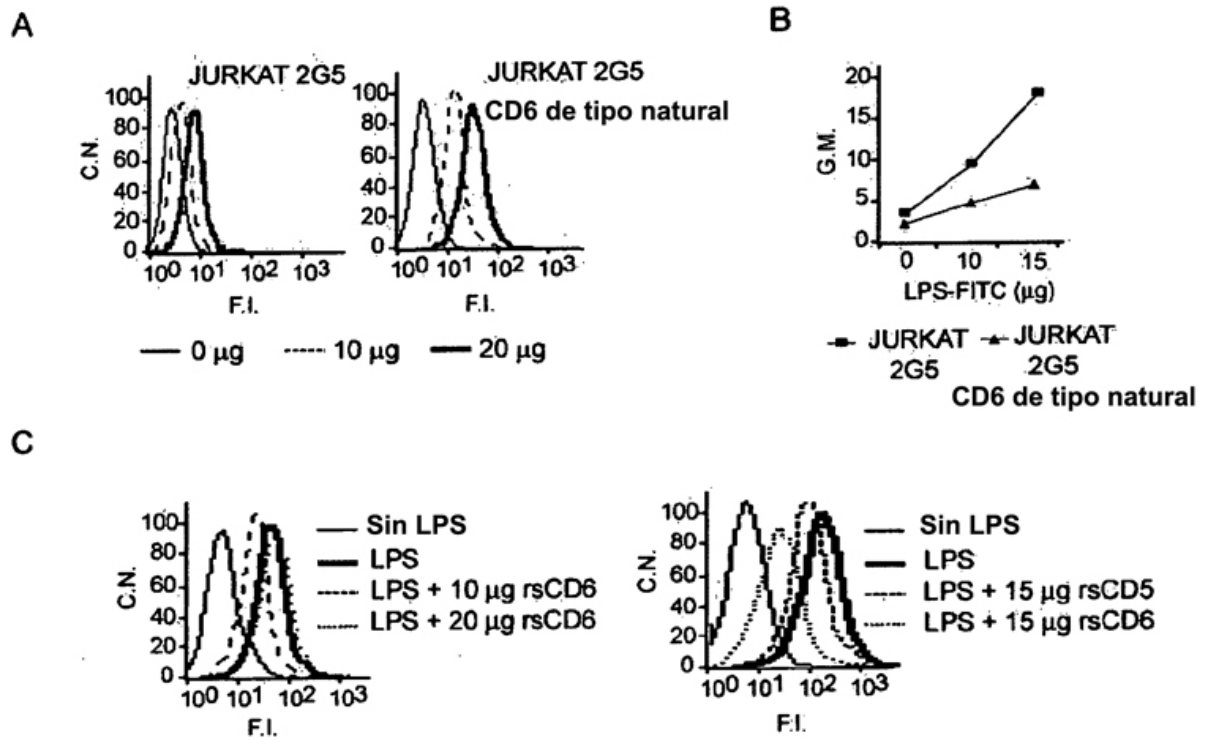
**FIG. 2**



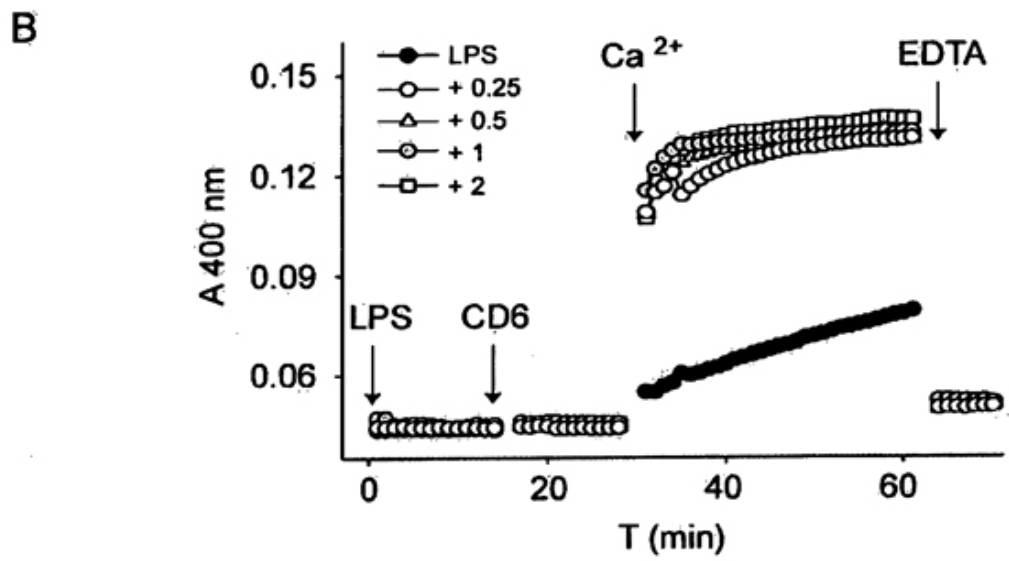
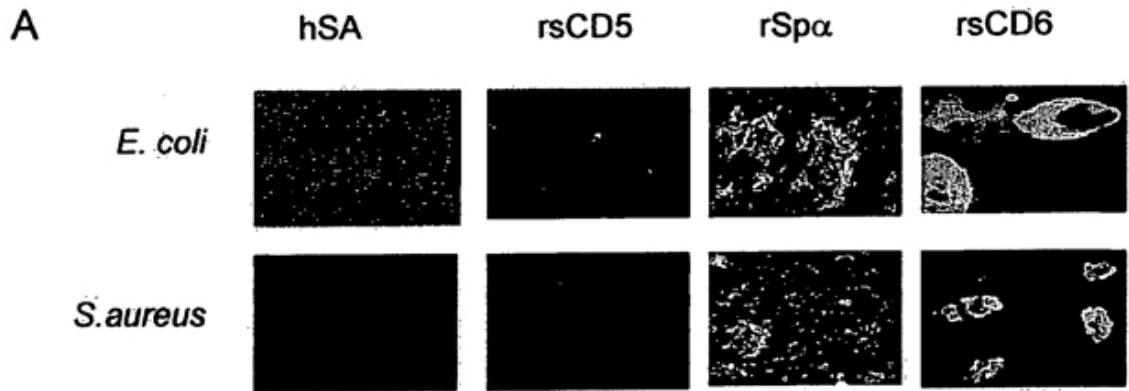
**FIG. 3**



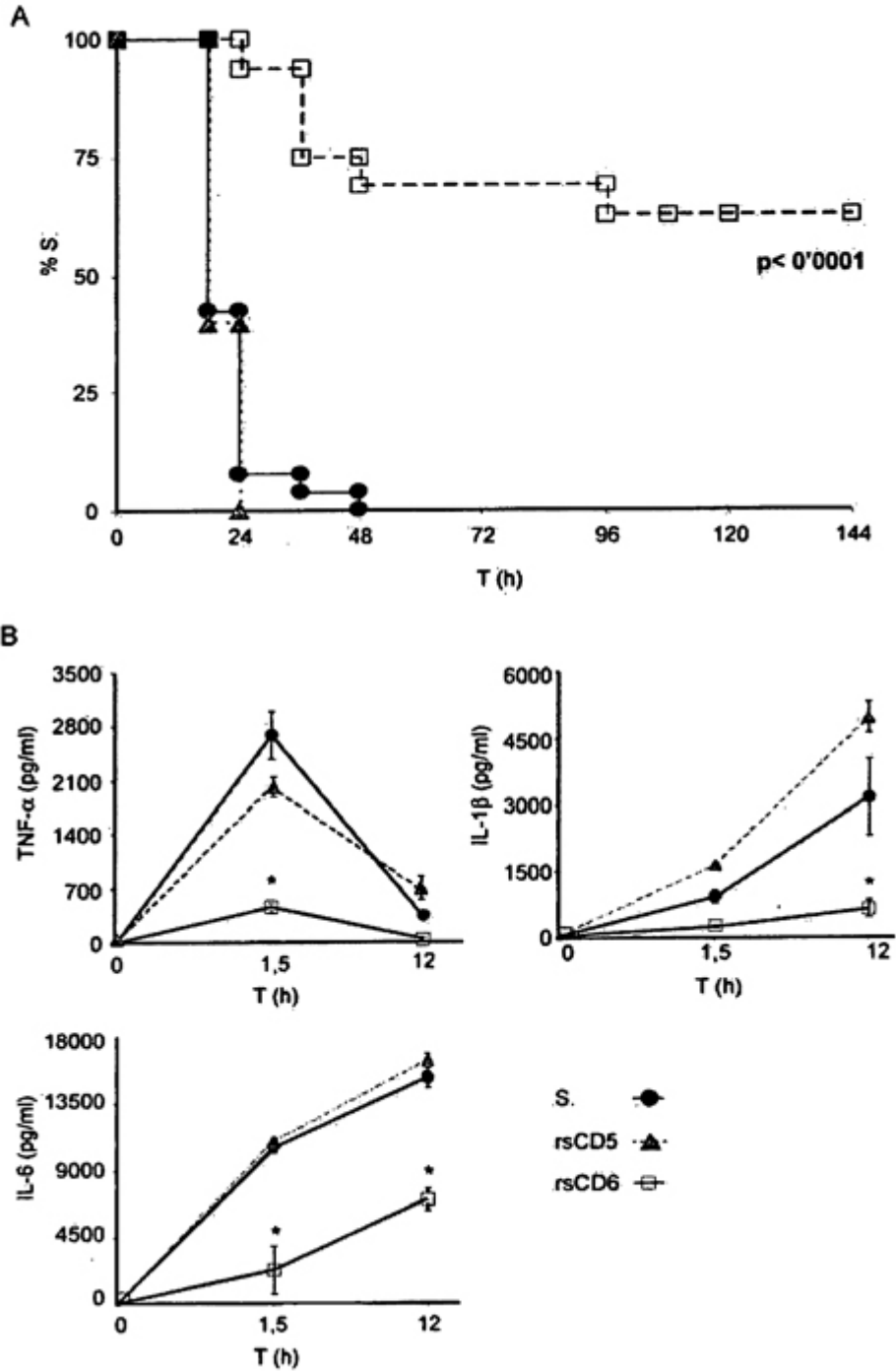
**FIG. 4**



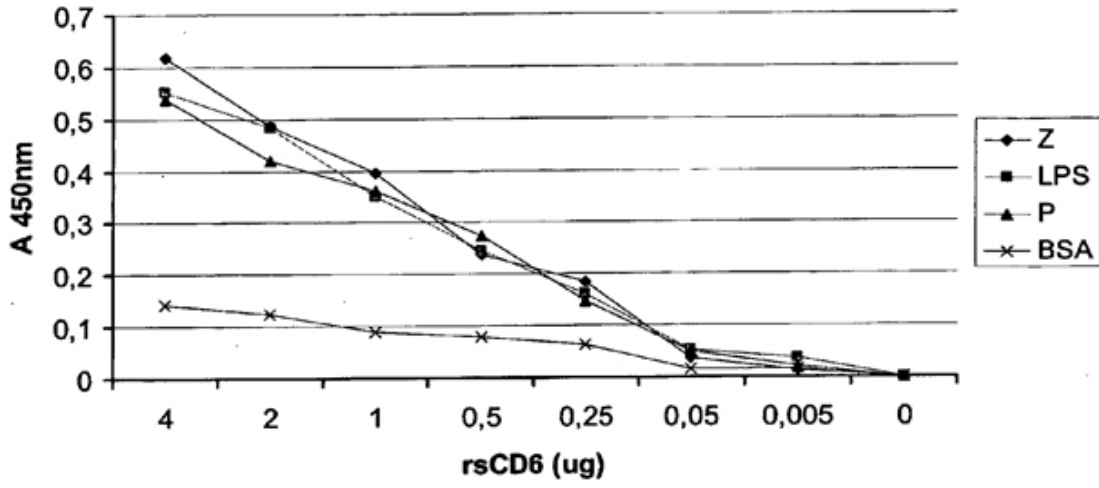
**FIG. 5**



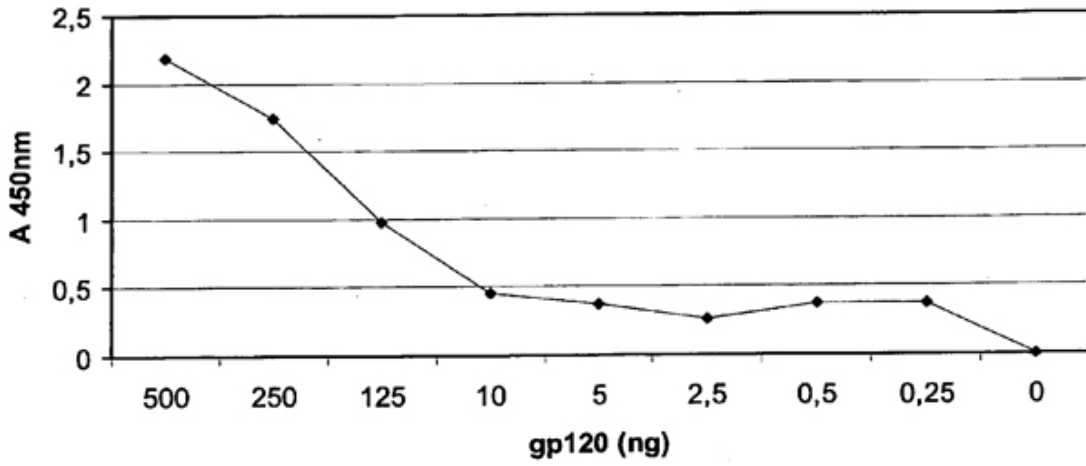
**FIG. 6**



**FIG. 7**



**FIG. 8**





**FIG. 9**

