

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 355**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7028 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2003 E 03772961 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 1569660**

54 Título: **Moléculas de unión a lectina de tipo C, identificación y usos de las mismas**

30 Prioridad:

07.11.2002 EP 02079665

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

18.12.2015

73 Titular/es:

**VERENIGING VOOR CHRISTELIJK
WETENSCHAPPELIJK ONDERWIJS (100.0%)
DE BOELELAAN 1105
NL-1081 HV AMSTERDAM, NL**

72 Inventor/es:

**GEIJTENBEEK, TEUNIS, BERNARD, HERMAN y
VAN KOOYK, YVETTE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 554 355 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

Moléculas de unión a lectina de tipo C, identificación y usos de las mismas

5 La invención se refiere al campo de la inmunología.

Las células dendríticas (DC) son células profesionales que presentan antígenos (APC) que inducen inmunidad celular después del reconocimiento de patógenos. Estas células por lo tanto son importantes en la defensa frente a muchos patógenos^{1;2;3}. Las DC inmaduras se siembran por todos los tejidos periféricos para que actúen como centinelas frente a patógenos invasivos⁴. Después de la captura del patógeno, las DC se activan, procesan patógenos para presentación a antígenos en las moléculas de la clase II del Complejo de Histocompatibilidad Principal (MHC), y migran hacia los órganos linfoides secundarios en los que activan a los linfocitos T sin tratamiento previo para iniciar algunas respuestas inmunes adaptativas^{1;3;4}. Dependiendo del patógeno que reconocen las DC, la diferenciación de los linfocitos T sin tratamiento previo en células Th1 se desencadena por las DC como respuesta a microbios intracelulares, mientras que las DC generan las respuestas mediadas por Th2 para eliminar patógenos que residen de forma extracelular³. Por lo tanto, las DC desempeñan un papel importante en las respuestas inmunes tanto innatas como celulares frente a antígenos tumorales así como patógenos tales como infecciones víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias^{1;5}. El conocimiento sobre receptores de la superficie celular en las DC que están implicados en el reconocimiento de patógenos solamente está comenzando a aparecer, e incluyen receptores de tipo Toll (TLR)^{6;7} y lectinas de tipo C⁸. Los TLR reconocen componentes derivados de patógenos específicos, tales como lipoproteínas, lipopolisacáridos y ADN bacteriano, y retransmiten esta información a través de cáscaras de señalización intracelulares que conducen a la producción de citoquinas reguladoras y regulación positiva de MHC y moléculas coestimuladoras que conducen a la activación/maduración de las DC⁶. Por el contrario, las lectinas de tipo C reconocen estructuras de carbohidrato derivadas de patógenos y después de unión internalizan patógenos para el procesamiento antigénico y la presentación a linfocitos T⁶⁻¹⁰. En las lectinas clásicas dependientes de calcio, algunos restos conservados de aminoácidos en el dominio de reconocimiento de carbohidrato (CRD) están implicados en la unión del calcio y la especificidad del azúcar¹¹. Se describe que un número creciente de lectinas de tipo C se expresan de forma específica por las DC. Para la mayoría de estas lectinas, se carece de conocimiento detallado sobre dianas de patógeno así como ligandos celulares si los hubiera, incluyendo la identidad de la estructura de carbohidrato que reconocen⁸. Una lectina DC-SIGN de tipo C específica de DC (no integrina para captura de ICAM-3 específica de células dendríticas, CD209) está implicada en la unión de la glicoproteína de envoltura del HIV-1 mediante DC para potencia la infección de los linfocitos T¹², mientras que el receptor de manosa (MR) está implicado en el reconocimiento de micobacterias y Hongos/Protozoos¹³. Algunas lectinas de tipo C como DC-SIGN pueden interactuar con autoglicoproteínas que contienen carbohidrato (ICAM-2 e ICAM-3) para mediar algunos procesos de adhesión celular^{14;15}.

Como se describe en el presente documento, una lectina de tipo C puede comprender especificidad para más de un tipo de glicoconjugado. Este conocimiento es útil para una diversidad de fines. Por ejemplo, algunas lectinas son fundamentales para mediar la unión a patógenos y por lo tanto, la presentación de antígenos en células dendríticas. Esta propiedad de unión de las lectinas de tipo C se usa mediante un número de patógenos para facilitar, al menos en parte, la infección de un individuo. El conocimiento de la especificidad de los glicoconjugados de tales lectinas proporciona por lo tanto una entrada para el desarrollo de medicamentos capaces de interferir con la capacidad de los carbohidratos presentes en patógenos para interactuar con una lectina y de este modo, al menos en parte, interferir con la infección o la gravedad de la misma en el individuo expuesto. La presente divulgación proporciona un método para inhibir, al menos en parte, la unión de un ligando a una lectina de tipo C o una parte de unión a carbohidrato del mismo, que comprende poner en contacto dicha lectina de tipo C con un glicoconjugado aislado y/o recombinante que comprende al menos dos restos de manosa que se unen en la posición α 1,2 o un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa o un glicoconjugado que comprende al menos un extremo de N-acetilglucosamina en reposo o un derivado o multímero del mismo. También se proporciona el uso de un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa o un derivado o multímero del mismo para inhibir, al menos en parte, la unión de un ligando a una lectina de tipo C o una parte de unión a carbohidrato del mismo. Este método se puede usar por ejemplo para estudiar las propiedades de unión exactas de una lectina. El método también es útil en la identificación de compuestos capaces de interferir con una capacidad de dicha lectina de tipo C para unirse a agentes patógenos. Dicho método comprende adicionalmente una célula que comprende dicha lectina de tipo C. Preferentemente dicha célula es una célula que presenta antígeno, más preferentemente una célula dendrítica o macrófago. En presencia de una célula de este tipo, el efecto de tal inhibición se puede comparar con la función de la célula que presenta antígeno, por ejemplo en su capacidad para presentar antígeno y/o la producción de linfoquinas y/o citoquinas. Dicha lectina de tipo C puede comprender DC-SIGN, mSIGNR1, L-SIGN y/o DC-SIGNR. Aunque DC-SIGNR y L-SIGN se expresan predominantemente en células de macrófago/endoteliales, en los ganglios linfáticos y en células endoteliales sinusoidales de hígado y DC-SIGN se expresa predominantemente en células dendríticas. DC-SIGNR y L-SIGN comparten los efectos de unión y señalización notables que tiene ManLAM después de unión a células dendríticas a través de DC-SIGN. Sin embargo, aunque DC-SIGN comprende adicionalmente una especificidad en particular para glicoconjugados que comprenden un resto de fucosa o un derivado o multímero del mismo, DC-SIGNR y L-SIGN carecen de tal especificidad en particular. En los métodos mencionados anteriormente, existe por lo tanto una preferencia hacia una lectina DC-SIGN de tipo C.

Con la expresión "glicoconjugado que comprende un resto de fucosa" se hace referencia a un glicoconjugado que comprende al menos un resto de fucosa que se une en la posición α 1,3 o α -1,4 al glicoconjugado. El resto de unión consiste preferentemente en N-acetilglucosamina. El resto de unión se acopla preferentemente a un oligosacárido o glicano, que a su vez puede ser parte de una estructura mayor (o molécula vehículo) que comprende glicoconjugados posteriores que comprenden un resto de fucosa, u otros compuestos tales como manosa en cualquier configuración. Un derivado de dicho glicoconjugado que comprende un resto de fucosa comprende la misma actividad de unión una lectina de tipo C en el tipo no necesariamente en la cantidad. Se puede generar un derivado a través de modificación del resto de fucosa. Tales modificaciones se pueden generar de diversas maneras. Preferentemente, dicha fucosa es una fucosa terminal, es decir, se une solamente a través de una unión en la posición α 1,3 o α -1,4 a otra molécula o fucosa. Algunos ejemplos preferentes de glicoconjugados que comprenden un resto de fucosa son los antígenos Le^x, Le^y, Le^a, Le^b y/o LDNF del grupo sanguíneo de Lewis. Modificaciones diferentes tienen efectos diferentes en las propiedades de unión una lectina. La sialilación de Le^x (que proporciona sialil-Le^x, un ligando de L-, E- y P-selectina) elimina completamente el reconocimiento por DC-SIGN, lo que indica que DC-SIGN tiene una especificidad de carbohidrato que es distinta de la de las selectinas que median los leucocitos rodantes. La sulfatación reduce la afinidad de unión de DC-SIGN hacia Le^x, así como hacia Le^a (Figura 2a). Un derivado de un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa comprende de este modo una modificación en el que dicha permite la unión de dicho glicoconjugado a dicha lectina de tipo C. Los glicoconjugados que comprenden múltiples restos de fucosa en la configuración de un antígeno del grupo sanguíneo de Lewis por lo general tienen una afinidad de unión más elevada que un glicoconjugado que comprende un solo resto de fucosa.

Un glicoconjugado puede ser mono o polivalente para los respectivos restos de fucosa. Un glicoconjugado polivalente comprende al menos dos antenas separadas en el que al menos dos de dichas antenas comprenden dichos restos. Un glicoconjugado polivalente preferente comprende al menos dos antenas que tienen una fucosa terminal, es decir, según en solamente a través de una unión en la posición α 1,3 o α -1,4 al glicoconjugado o a otro resto de fucosa. Un glicoconjugado polivalente preferente comprende al menos dos antenas que tienen al menos dos restos de manosa que se unen en la posición α 1,2. Un glicoconjugado polivalente también puede comprender al menos dos antenas que tienen una N-acetilglucosamina terminal, es decir, se une solamente a través de una unión al glicoconjugado. Un multímero es preferentemente un glicoconjugado polivalente.

Una molécula de unión puede ser específica para un glicoconjugado monovalente o uno polivalente. La unión de la molécula de unión por lo general es más fuerte para el glicoconjugado polivalente.

La unión de una lectina de tipo C y más en particular, la acción posterior de la célula que porta una lectina de tipo C por lo general es significativamente más elevada en el caso de la unión de un glicoconjugado polivalente. En particular, esto es de este modo para glicoconjugados que comprenden al menos un extremo de N-acetilglucosamina en reposo.

Las moléculas vehículo pueden comprender adicionalmente una gran diversidad de diferentes moléculas que incluyen péptidos, proteína, lípido, polisacárido y también moléculas sintéticas no mencionadas de forma expresa aquí. Por supuesto, la molécula o moléculas vehículo pueden ser parte de una estructura e incluso más grande tal como una superficie biológica o artificial, un virus, una bacteria o una célula eucariota.

La unión del ligando a una lectina de tipo C se puede inhibir mediante la interferencia con el sitio de unión en el ligando, con el sitio de unión de una lectina de tipo C o ambos. La interferencia con el sitio de unión del ligando se puede realizar usando una molécula de unión al ligando capaz de unirse de forma específica a la parte de unión a una lectina de tipo C en el ligando. Esto se realiza preferentemente con una molécula proteica tal como un anticuerpo específico de carbohidrato preferentemente específico para un glicoconjugado que comprende al menos dos restos de manosa que se unen en la posición α 1,2 o un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa o un glicoconjugado que comprende al menos un extremo de N-acetilglucosamina en reposo o un derivado o multímero del mismo. La parte experimental describe ejemplos de tales anticuerpos. Algunos ejemplos de anticuerpos que comprenden una especificidad para un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa o un derivado o multímero del mismo son SMLDN1.1 o SMFG4.1, 6H3, Hp151, 4D2, 54.1F6A, NAM61-1A2 o SMLDN1.1. La molécula de unión al ligando también puede ser una lectina de tipo C, preferentemente un derivado soluble del mismo, que comprende especificidad para un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa un derivado o multímero del mismo. Un ejemplo de una lectina de tipo C soluble de la invención es una molécula quimérica de DC-SIGN-Fc soluble que comprende los restos de aminoácidos 64-404 fusionados en el extremo C-terminal a un fragmento de IgG1-Fc humano como se describe, por ejemplo, en Geijtenbeek *et al.*, (Geijtenbeek *et al.*, 2002, J. Biol. Chem. 277: 11314-11320). Sin embargo, las lectinas de tipo C solubles que comprenden una o más de las especificidades proporcionadas se pueden generar de diversas maneras (por ejemplo mediante derivación de DC-SIGNR o L-SIGN). Ahora que la presente divulgación describe una molécula química, se pueden generar otras, por ejemplo, como se describe en Fawcett J *et al.*, (Fawcett J *et al.*, 1992, Nature 360: 481-4).

Por supuesto, la interferencia con el sitio de unión en una lectina de tipo C también se puede realizar de diferentes maneras. La interferencia con el sitio de unión en una lectina de tipo C se puede realizar usando una molécula de unión a lectina de tipo C capaz de unirse de forma específica a la parte de unión al ligando en la lectina de tipo C. Esto se realiza preferentemente con una molécula proteica tal como un anticuerpo específico para lectina de tipo C o

con un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa o un derivado o multímero del mismo, en la que dicho glicoconjugado o ambos pueden ser parte de una estructura más grande. Por supuesto, la unión se puede inhibir adicionalmente mediante impedimento estérico de la unión del ligando a la lectina de tipo C. Por esto, no es absolutamente necesario que la molécula de interferencia por sí mismas se una al sitio de asociación del carbohidrato y la lectina de tipo C. la unión también se puede interferir con impedimento satisfactoriamente estérico mediante la unión de la molécula de interferencia en la cercanía del sitio de asociación.

El ligando puede ser cualquier tipo de estructura capaz de unirse a dicha lectina de tipo C. Normalmente este comprenderá una molécula proteica o un carbohidrato. El ligando puede ser un anticuerpo. Es preferente, pero no estrictamente necesario, que el ligando comprenda glicanos manosilados tales como componentes de la pared celular de la Micobacteria ManLAM, o un derivado de manosa, lipofosfoglicano tal como el derivado de Leishmania, o un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa tal como SEA o CD66 o un derivado o multímero del mismo. El ligando puede tener en lugar de, o además de, un glicoconjugado que comprende una fucosa o un derivado o multímero del mismo, diferentes glicoconjugados capaces de unirse a al mismo en la lectina de tipo C.

El ligando comprende preferentemente un antígeno. El ligando, como se ha mencionado anteriormente, puede comprender un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa. El antígeno comprende o no dicho glicoconjugado. En un ligando preferente, el antígeno comprende dicho glicoconjugado. El ligando comprende preferentemente un receptor asociado a un antígeno (tumoral), un patógeno y/o una célula. Aquí un antígeno se usa para que incluya péptidos o glicolípidos y derivados de los mismos capaz de presentarse en el contexto de la clase I o la clase II, o CD1b de MHC. Al menos algunas lectinas de tipo C, y en particular las expresadas en células dendrítica están implicadas en el proceso de absorción de antígeno y presentación del mismo por las células que presentan antígeno. Una etapa inicial de este proceso es la captura del antígeno por tales lectinas. Es posible, al menos en parte, interferir con esta etapa inicial en el proceso de presentación de antígeno. Teniendo en cuenta la importancia de la presentación del antígeno en el inicio y mantenimiento de respuestas inmunes específicas de antígeno, es evidente que el método se puede usar de forma favorable para disminuir, al menos en parte, la potencia de una respuesta inmune frente a dicho antígeno.

El ligando puede comprender un patógeno o una parte de unión a lectina de tipo C del mismo. Se ha encontrado que muchos patógenos diferentes comprenden carbohidratos capaces de unirse a lectinas de tipo C. En particular se ha encontrado que algunos patógenos o partes de los mismos se pueden unir a dichas lectinas de tipo C a través de un glicoconjugado que contiene manosa tal como un glicoconjugado que comprende una fucosa o derivado o multímero del mismo. Esta unión, al menos en parte, facilita la infección de un individuo con dicho patógeno. De este modo, la interferencia con la unión del patógeno o parte del mismo a la lectina de tipo C puede, al menos en parte, ayudar a un individuo a combatir una infección por el patógeno y en algunos casos incluso puede prevenir el establecimiento de síntomas clínicamente visibles de la misma. Lo último es útil en estrategias de vacunación (pasiva o activa). El patógeno puede ser un virus, un hongo, una (mico)bacteria y/o un parásito. El patógeno puede comprender un glicoconjugado que comprende al menos dos restos de manosa que se unen en la posición $\alpha 1,2$ o un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa o un glicoconjugado que comprende al menos un extremo de N-acetilglucosamina en reposo o un derivado o multímero del mismo. Algunos ejemplos de patógenos son el virus de inmunodeficiencia humana, un *helicobacter*, una *Neisseria meningitidis*, una *leishmania*, un *esquistosoma*, una *Klebsiella*, un lactobacilo probiótico, virus de la hepatitis C, un virus del herpes simplex o un virus del Ébola. La inhibición de la unión de los patógenos mencionados específicamente se puede conseguir usando un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa o un derivado o multímero del mismo. La inhibición de la unión se consigue usando una molécula de unión a ligando (patógeno o parte del mismo) capaz de unirse de forma específica a la parte de unión a la lectina de tipo C en el ligando. Esto se realiza preferentemente con una molécula proteica tal como un anticuerpo específico de carbohidrato específico preferentemente para un carbohidrato de manosa tal como un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa o un derivado o multímero del mismo. La parte experimental describe ejemplos de tales anticuerpos. La molécula de unión al ligando también puede ser una lectina de tipo C, preferentemente un derivado soluble de la misma, que comprende especificidad para un carbohidrato de manosa tal como un glicoconjugado que comprende una fucosa o un derivado o multímero del mismo. Un ejemplo de una lectina de tipo C soluble es una DC-SIGN-Fc soluble como se ha mencionado anteriormente. Por lo tanto, las infecciones de un individuo con dichos patógenos pueden prevenir o tratar a dicho individuo, al menos en parte, mediante la administración a dicho individuo de un carbohidrato de manosa tal como un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa un derivado o multímero del mismo. Además, una molécula de unión al ligandos se administra a dicho individuo. Esto también se puede usar, al menos en parte, para inhibir la unión del patógeno a una célula que expresa lectina de tipo C inhibiendo de este modo, al menos en parte, la contaminación o propagación del patógeno en el organismo del paciente, así como inhibiendo la maduración de DC y la adhesión celular, como también se describe a continuación.

Algunas lectinas de tipo C no solamente reconocen perfiles de carbohidrato en patógenos sino que también interactúan con autoglicoproteínas para mediar procesos celulares tales como diferenciación y migración. Por lo tanto, se puede usar un método para interferir con la interacción de uno o más autoglicoproteínas y de este modo se puede usar para inhibir, al menos en parte los procesos celulares en los que están implicadas las lectinas de tipo C mencionadas. Esto se puede realizar proporcionando las estructuras de carbohidrato como se describe en el presente documento (es decir, glicoconjugado que contiene manosa tal como un glicoconjugado que comprende un

resto de fucosa o derivado o multímero del mismo). Preferentemente, esto se consigue usando una molécula de unión a ligando. Por lo tanto, el método se usa para inhibir, al menos en parte, la unión de dicha lectina de tipo C a una autoglicoproteína, preferentemente un receptor presente en la membrana externa de una célula. Preferentemente dicho precepto comprende ICAM-2, ICAM-3, CD11b, CD166 o CD66 o una parte funcional, derivado y/o análogo de los mismos. CD166 y CD66 están presentes en un subconjunto de linfocitos NK y granulocitos. Dentro del subconjunto de variantes de CD66, el receptor comprende preferentemente CD66a y/o CD66e. Por lo tanto, la interacción de estas células con una célula que comprende una lectina de tipo C mencionada se puede inhibir, al menos en parte, usando un asociado de unión específico para una lectina de tipo C mencionado anteriormente. Por lo tanto, la interacción preferentemente de células dendríticas y dicho subconjunto de linfocitos NK y granulocitos pueden interferir entre sí. A través de esta interacción es posible modificar una respuesta inmune. Por ejemplo, mediante la inhibición, al menos en parte, de la unión de un granulocito a una célula dendrítica, al proporcionar la lectina de tipo C, es posible inhibir, al menos en parte, la cantidad de una respuesta inmune eficaz frente a antígenos llevados por el granulocito. Por otro lado, es posible aumentar o inducir una respuesta inmune específica de antígeno eficaz proporcionando la célula que presenta antígeno con un ligando que comprende dicho antígeno y un glicoconjugado que comprende al menos dos restos de manosa, un resto de fucosa y/o un extremo de N-acetilglucosamina en reposo. Preferentemente, dicha lectina de tipo C comprende DC-SIGN. Como asociado de unión específico de dicha lectina de tipo C, se puede usar de forma ventajosa un glicoconjugado que contiene manosa tal como un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa o un derivado o multímero del mismo.

Por lo tanto, la invención se refiere al uso de un glicoconjugado que comprende un antígeno tumoral y un antígeno de Lewis x no sialilado capaz de unirse a DC-SIGN en una célula que presenta antígeno para la preparación de una composición para la estimulación de una respuesta inmune frente al antígeno tumoral en un individuo. En una realización preferente, el antígeno tumoral es un péptido o glicolípido capaz de presentarse en el contexto de la clase I o la clase II o C1b de MHC.

En otras palabras, la invención se refiere a una composición para uso en la estimulación de una respuesta inmune frente a un antígeno tumoral en un individuo, comprendiendo dicha composición un glicoconjugado del antígeno tumoral y un antígeno de Lewis x no sialilado capaz de unirse a DC-SIGN en una célula que presenta antígeno. En una realización preferente, el antígeno tumoral es un péptido o glicolípido capaz de presentarse en el contexto de la clase I o la clase II o C1b de MHC.

El documento de patente WO 97/27872 describe que un antígeno que comprende antígeno de Lewis x tiene un efecto de estimulación en la respuesta inmune de ratones infectados con *S. mansoni*. El documento de patente WO 97/27872 se refiere a un método para modular una respuesta inmune. El método comprende poner en contacto una célula inmune con una forma simuladora o inhibidora de un antígeno de Lewis. El efecto de esta puesta en contacto es que la célula inmune produce moléculas inmunoestimuladoras que aumentan una respuesta inmune. El documento de patente WO 97/27872 detalla la estimulación de la producción de IL-10 por esplenocitos en ratones infectados con *S. mansoni*. Más en particular, el documento de patente WO97/27872 describe conjugados entre LNFP-III (que comprende Lewis X) y albúmina de suero humano (HSA). Estos conjugados se sometieron a ensayo por su capacidad para estimular las PBMC de seres humanos que padecían cáncer de pulmón y de colon. Por lo tanto, D5 enseña que el antígeno de Lewis X se va a conjugar con HSA, que no es un antígeno tumoral.

La interacción celular de DC con granulocitos o linfocitos NK es esencial en la respuesta inmune innata. En particular, algunos granulocitos están implicados en la ingestión temprana de patógenos y pueden atraer y estimular a las DC para que participen en el reconocimiento de patógenos y presentación a linfocitos T. Por el contrario, se sabe que algunos linfocitos NK están implicados en la eliminación de células infectadas. Los linfocitos NK pueden eliminar o activar las DC que permiten la lisis de las DC capturadas por patógeno o la maduración de las DC capturadas por el patógeno para aumentar la estimulación y la respuesta inmune de los linfocitos T. La interacción celular de granulocitos y linfocitos NK con DC es aumentar la inmunidad frente a patógenos o eliminar las infectadas con DC patógenos.

Esta descripción también proporciona un método para inhibir, al menos en parte, la maduración o la activación de una célula que presenta antígeno que comprende suministrara dicha célula que presenta antígeno un glicoconjugado de unión a DC-SIGN que comprende un resto de fucosa. Usando esta técnica, es posible, por ejemplo, amortiguar una respuesta inmune. Es posible inducir adicionalmente una tolerancia del antígeno a través de este método, por ejemplo, se puede proporcionar antígeno junto con el glicoconjugado. En el caso en el que la célula que presenta antígeno se active a través de una ruta de receptor de tipo toll, el equilibrio entre el nivel de activación/inhibición determina la maduración o activación de la célula que presenta antígeno. Cuando la ruta de TLR está fuertemente activada mientras que ruta de la lectina de tipo C no lo está, el equilibrio se desplaza hacia la activación de la célula que presenta antígeno mientras que en la situación inversa, el equilibrio se desplaza hacia la tolerancia e inhibición de la maduración o la activación.

El virus de inmunodeficiencia humana se une a DC-SIGN a través de un glicoconjugado que tiene al menos dos restos de manosa. *Helicobacter* y en particular *Helicobacter pylori* se une a DC-SIGN a través de un glicoconjugado que tiene un antígeno de Lewis^x. *Neisseria meningitidis* se une a DC-SIGN a través de un glicoconjugado que tiene un resto de N-acetilglucosamina. La *Leishmania mexicana* se une a DC-SIGN a través de un glicoconjugado que

tiene al menos dos restos de manosa. El *Schistosoma mansoni* se une a DC-SIGN a través de un glicoconjugado que tiene un antígeno de Lewis. La *Klebsiella pneumoniae* se une a DC-SIGN a través de un glicoconjugado que tiene al menos dos restos de manosa. El virus de la hepatitis C se une a DC-SIGN a través de un glicoconjugado que tiene al menos dos restos de manosa. El virus del herpes simplex se une a DC-SIGN a través de un glicoconjugado que tiene al menos dos restos de manosa. El virus del Ébola se une a DC-SIGN a través de un glicoconjugado que tiene al menos dos restos de manosa.

Para alterar la respuesta inmune en un organismo frente a los patógenos mencionados, una molécula de unión inhibe preferentemente de este modo, al menos en parte, la unión de los respectivos glicoconjugados a la lectina de tipo C.

Las DC inmaduras son altamente eficaces en la captura y procesamiento del antígeno, mientras que las DC maduras se especializan en la activación de los linfocitos T sin tratamiento previo necesaria para respuestas inmunes celulares. Las DC inmaduras maduran como respuesta a señales específicas de 'peligro' tales como componentes bacterianos (LPS) o citodinas inflamatorias (TNFa, PGE2). Se encontró que un glicoconjugado que comprende una manosa, un resto de fucosa o un derivado, una combinación o multímero del mismo, no induce la maduración de las DC. Al contrario que al LPS que desencadena TLR4, no se observó una expresión regulada de forma positiva de los marcadores de activación CD80, CD83, CD86 o HLA-DR. Sin embargo, cuando se estudió la maduración de células dendríticas inmaduras en la situación en la que las células también se activaban a través de una ruta de receptor de tipo Toll, se observó una fuerte inhibición de la maduración inducida por el receptor de tipo Toll, en particular cuando la célula dendrítica se exponía a ManLAM. Por lo tanto, tal inhibición amortiguada respuesta de las células dendríticas estimuladas con la ruta del receptor de tipo Toll y por lo tanto, la capacidad de un individuo para luchar contra patógenos que se combaten mediante la activación de la ruta del receptor de tipo Toll. Esta amortiguación de la activación de DC se puede evitar, al menos en parte, inhibiendo, al menos en parte, la unión de un glicoconjugado en particular que comprende al menos dos restos de manosa que se unen en la posición $\alpha 1,2$, y además glicoconjugados que actúan de forma análoga para las lectinas de tipo C en las células dendríticas inmaduras. Por lo tanto, la presente descripción proporciona un método para determinar si un compuesto es capaz de modular un estado de activación de una célula dendrítica que comprende proporcionará dicha célula dendrítica un compuesto capaz de unirse de forma específica a una lectina de tipo C y determinar si se modula una ruta de señalización del receptor de tipo Toll en dicha célula dendrítica. Además se proporciona un método para modular la actividad de una ruta de señalización del receptor de tipo Toll en una célula, en el que dicha célula comprende un receptor de tipo Toll y una lectina de tipo C, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con una molécula de unión a lectina de tipo C aislada y/o recombinante. Preferentemente dicha molécula de unión a lectina de tipo C comprende un glicoconjugado que comprende una manosa, un resto de fucosa o un derivado una combinación o multímero del mismo. La actividad se puede modular de forma positiva evitando, al menos en parte, la estimulación simultánea de la lectina de tipo C con un glicoconjugado que comprende al menos dos restos de manosa que se unen en la posición $\alpha 1,2$ o compuesto que actúa de forma análoga. La actividad se modula de forma negativa proporcionando de forma simultánea dicho glicoconjugado que comprende al menos dos restos de manosa que se unen en la posición $\alpha 1,2$ o compuesto que actúa de forma análoga. Los compuestos que actúan de forma análoga comprenden la misma señalización del receptor de tipo Toll que interfiere con la capacidad como ManLAM en tipo pero no necesariamente en cantidad. Un compuesto que actúa de forma análoga preferente comprende un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa o un derivado o multímero del mismo. Un nivel de control adicional es posible usando compuestos de unión a lectina de tipo C que interfieren, al menos en parte, con la capacidad de unión de un glicoconjugado que comprende al menos dos restos de manosa que se unen en la posición $\alpha 1,2$ o compuesto que actúa de forma análoga. De este modo, la actividad de la ruta del receptor de tipo Toll se puede modular de forma positiva (en presencia del ligando receptor de tipo Toll apropiado) incluso en presencia de un glicoconjugado que comprende al menos dos restos de manosa que se unen en la posición $\alpha 1,2$ o compuesto que actúa de forma análoga. La última característica es de importancia en casos en los que el sistema inmune tiene problemas para combatir una infección a través de la ruta del receptor de tipo Toll, en particular cuando dicha infección va acompañada de secreción de un glicoconjugado que comprende al menos dos restos de manosa que se unen en la posición $\alpha 1,2$ o compuestos que actúan de forma análoga, tales como micobacterias y en particular *M. tuberculosis* y *M. Bovis*. Por lo tanto, la presente divulgación también proporciona un método para estimular la maduración de una célula dendrítica que se pone en contacto con un mirando de receptor de tipo Toll y un glicoconjugado que comprende al menos dos restos de manosa que se unen en la posición $\alpha 1,2$ o compuesto que actúa de forma análoga, comprendiendo dicho método proporcionar a dicha célula dendrítica una molécula de unión a lectina de tipo C capaz de bloquear la unión de dicho glicoconjugado a dicha lectina de tipo C. Algunas moléculas de unión a lectina de tipo C son capaces de inhibir, al menos en parte, la unión de un glicoconjugado que comprende al menos dos restos de manosa que se unen en la posición $\alpha 1,2$ o compuesto que actúa de forma análogas son, por ejemplo, anticuerpo de unión a lectina de tipo C o una parte funcional del mismo, derivado y/o análogo del mismo, con una especificidad de unión que bloquea o cubre el sitio de unión de ManLAM en dicha lectina de tipo C. Preferentemente, dicha lectina de tipo C comprende DC-SIGN. Dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo específico para DC-SIGN. Un ejemplo adecuado de tal anticuerpo es AZN-D1, AZN-D2 o AZN-D3 o un análogo humano o humanizado que comprende la misma especificidad de unión en tipo, no necesariamente en cantidad. La presente divulgación también proporciona un método para estimular la maduración de una célula dendrítica que se pone en contacto con un ligando de receptor de tipo Toll y un glicoconjugado que comprende al menos dos restos de manosa que se unen en la posición $\alpha 1,2$ o compuesto que actúa de forma análoga, comprendiendo dicho método proporcionar a dicha célula dendrítica una molécula de unión a ligando, evitando de

este modo, al menos en parte, la unión de dicho glicoconjugado que comprende al menos dos restos de manosa que se unen en la posición $\alpha 1,2$ o compuesto que actúa de forma análoga, a la célula dendrítica.

En el presente documento también se proporciona el uso de un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa o un derivado o multímero del mismo, una molécula de unión a ligando y/o una molécula de unión a lectina de tipo C para la preparación de un medicamento. Tales medicamentos se pueden usar para el tratamiento de una enfermedad asociada al sistema inmune o el tratamiento de una enfermedad adquirida. Preferentemente, dicha enfermedad adquirida comprende la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana, un *Helicobacter*, una *Neisseria Meningitidis*, una *leishmania*, un *esquistosoma*, una *Klebsiella*, un lactobacilo probiótico, virus de la hepatitis C, un virus del herpes simplex o un virus del Ébola.

Considerando el papel natural de las lectinas de tipo C en células que presentan antígeno, está dentro del alcance de la presente divulgación la estimulación de respuestas inmunes en un individuo al proporcionar un antígeno a través de un receptor de lectina de tipo C en la célula que presenta antígeno. Por supuesto, esto se puede conseguir cuando el antígeno comprende un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa o derivado con multímeros del mismo. En este método, es preferente que la activación simultánea de la ruta de señalización del receptor de tipo Toll se evite, al menos en parte. Por lo tanto, se proporciona un glicoconjugado que comprende un antígeno y un glicoconjugado que comprende un resto de fucosa o un derivado o multímero del mismo para uso para la preparación de una vacuna. La vacuna puede ser preventiva o curativa. El antígeno se puede derivar de cualquier fuente siempre y cuando sea capaz de su presentación a través del complejo I, el complejo II o C1b de histocompatibilidad principal. En una realización preferente, dicho antígeno comprende un antígeno tumoral. La presencia de los carbohidratos mencionados en células tumorales facilita la captura del antígeno por las DC para aumentar la presentación del antígeno y como resultado la activación inmune. Por otro lado, la respuesta inmune frente al antígeno tumoral que carece de los carbohidratos mencionados se puede estimular de forma significativa proporcionando al antígeno uno o más de los carbohidratos mencionados estimulando de este modo la absorción de DC y por lo tanto la respuesta inmune frente al antígeno. Este aspecto es útil en la preparación de vacunas.

Se ha demostrado que DC-SIGN tiene una especificidad de carbohidrato para los carbohidratos que contienen manosa, antígenos de Lewis y estructuras que contienen GlcNAc (Figuras 33, 34, 63-66). Los inventores han demostrado que la especificidad del carbohidrato de L-SIGN es diferente ya que no reconoce estructuras de carbohidrato de antígeno de Lewis mientras que reconoce estructuras de alta manosa (Figuras 33 y 34). El homólogo murino, mSIGNR1, reconoce al igual que DC-SIGN, alta manosa y antígenos de Lewis, pero también tiene especificidad para antígenos de Lewis sialilados al contrario que DC-SIGN y L-SIGN (Figuras 33 y 34).

DC-SIGN es una lectina de tipo C expresada altamente en particular en células dendríticas. Su función es reconocer el antígeno y procesar y presentar resto de forma muy eficaz en moléculas de la clase I y II de MHC.

Durante mucho tiempo se ha pensado que DC-SIGN es un receptor de reconocimiento de patógenos que reconoce patógenos para activar el sistema inmune, pero en la actualidad parece que todos los patógenos de la larga lista que se dirigen a DC-SIGN persisten y escapan de la inmunidad mediante diferentes mecanismos. Los inventores tienen ahora cuatro ejemplos de patógenos que se dirigen a DC-SIGN para sobrevivir en el hospedador.

1. HIV-1 y VHC se dirigen a DC-SIGN para 'escondarse' dentro de las DC y escapar de la ruta intracelular al compartimento lisosómico.
2. La secreción de ManLam mediante micobacterias se dirige a DC-SIGN para inducir la maduración de las DC inducida por la modulación negativa de TLR, y la inducción de IL-10.
3. El patógeno gástrico humano, *Helicobacter pylori*, persiste: Algunas variantes de fase de lipopolisacárido modulan el equilibrio de Th1/Th2 mediante la interacción con la lectina de célula dendrítica, DC-SIGN.
4. Lactobacillus se dirige a DC-SIGN en DC e induce linfocitos T reguladores, la inhibición del reconocimiento de Lactobacillus mediante DC-SIGN reduce el estado regulador de los linfocitos T.

Por lo tanto, DC-SIGN es un receptor que reconoce 'normalmente' al autoantígeno a tolerar (Annual Review Immunology, 2004). Los inventores han demostrado aquí que el direccionamiento de DC-SIGN mediante lactobacilos puede inducir ciertamente los linfocitos T reguladores. Además, parece que DC-SIGN también puede reconocer al antígeno tumoral CEA (CD66e) en particular Lewis X e Y. Estos antígenos tumorales se pueden secretar y suprimir la activación de DC de una manera similar a la de ManLam de *Mycobacteria tuberculosis*. La integración de DC con granulocitos se pone en evidencia por el hecho de que DC-SIGN reconoce CD66a y CD11b en granulocitos. En particular, se reconoce el antígeno de Lewis X en estas moléculas. De este modo, DC-SIGN funciona como un receptor de la adhesión celular que media interacciones celulares de los granulocitos con DC. Esta función de adhesión celular entre granulocitos y células dendríticas nunca se ha informado pero es probable que la interacción de granulocitos y DC sea esencial para formar un puente entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa de una manera tal que el granulocito pase los agentes infecciosos a las DC aumentando una respuesta inmune adecuada. En particular el granulocito activa y madura las DC, induciendo la regulación positiva de las citoquinas y las moléculas coestimuladoras que es necesaria para la migración de DC y el inicio de la respuesta inmune adaptativa. La interacción de DC con granulocitos también se observa *in vivo* en la situación de la enfermedad de Crohn. Un nuevo patógeno que interactúa con DC-SIGN en las DC es *Neisseria Meningitidis*. Las variantes de cepa demuestran que en particular interactúa un mutante IgtB de una cepa que

contiene resto de GlcNAc con extremo en reposo. Otros experimentos (Figura 66) demuestran que la DC-SIGN también reconoce a GlcNAc.

5 La presente divulgación también proporciona el uso de molécula de unión a ligando y/o una molécula de unión a lectina de tipo C para la preparación de una vacuna. Una amortiguación del sistema inmune debido al efecto de un glicoconjugado que comprende al menos dos restos de manosa que se unen en la posición α 1,2 o compuestos que actúan de forma análoga se reduce proporcionando un glicoconjugado o anticuerpo capaz de inhibir, al menos en parte, la unión de un glicoconjugado que comprende al menos dos restos de manosa que se unen en la posición α 1,2 o compuesto que actúa de forma análoga a su receptor de lectina de tipo C. El anticuerpo comprende preferentemente SMLDN1.1, SMFG4.1, 6H3 o SMLDN1.1. Por lo tanto, el antígeno presente en dicha vacuna o proporcionado por separado es más eficaz en la estimulación o refuerzo de una respuesta inmune en presencia de un glicoconjugado que comprende al menos dos restos de manosa que se unen en la posición α 1,2 o compuesto que actúa de forma análoga. Esto es particularmente importante en pacientes que padecen una infección por micobacterias, tal como, pero no limitada a, *M. tuberculosis* o *M. bovis*. Preferentemente, dicha vacuna se usa para 15 estimular una respuesta inmune específica del antígeno en dicho individuo. En una realización preferente, el medicamento o vacuna se usa para el tratamiento de un individuo que padece un cáncer.

20 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos derivados de seres humanos u otros animales. El anticuerpo se produce preferentemente fuera del organismo. El anticuerpo también se puede generar o seleccionar usando sistemas artificiales tales como selección de presentación de fagos. Por lo tanto, un anticuerpo que no tiene homólogo natural también está incluido en el término. Los anticuerpos como se usa en el presente documento también incluyen fragmentos de los mismos capaces de unirse a la misma diana, tales como fragmentos de FAB o incluso partes más pequeñas. La parte de un anticuerpo de unión al antígeno también se puede injertar en otro tipo de molécula para proporcionar esa molécula con una especificidad de unión. Por supuesto, también es posible la modificación del anticuerpo para que incluya versiones humanas humanizadas del mismo con la misma especificidad y unión en tipo, pero no necesariamente en cantidad. También se incluyen fragmentos de una sola cadena y variantes de los mismos.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión molécula proteica se refiere a un péptido, un polipéptido, proteína y similares con o sin modificaciones. Tales modificaciones deben ser sintéticas y/o se pueden proporcionar mediante un sistema biológico. Lo último incluye, por ejemplo, modificación después de la traducción tal como glicosilación.

30 Aunque la invención se describe para uso en seres humanos, la invención también es funcional en otros animales, por ejemplo, animales de granja y mascotas. País que inicia por lo tanto, estos usos médicos y de vacuna también forman parte de la invención.

Breve descripción de las figuras

40 Figura 1. Los neoglicoconjugados de Le^x se unen con afinidad elevada a DC-SIGN.
a. Diagrama esquemático de las estructuras covalentes de las cadenas de glicano de glicoconjugados sintéticos usados en el ensayo de unión a DC-SIGN. b y c. Los glicoconjugados se revistieron y la unión de la DC-SIGN-Fc recombinante se midió después de incubación con Fc de cabra-anti-humano marcado con peroxidasa. El anticuerpo monoclonal anti-DC-SIGN, AZN-D1, se usó para bloquear la unión. c. La valoración de los glicoconjugados reveló que DC-SIGN se une con afinidad elevada a glicoconjugados de Le^x , Le^y , Le^a , Le^b , o LDNF y α 1,3, α -1,6 manotriosa, sulfo-Lea, mientras que tiene una afinidad de unión menor para α -manosa, y α -L-fucosa, y sialil- Le^x .

50 Figura 2. La DC-SIGN celular presenta una especificidad de unión similar a la de la DC-SIGN-Fc soluble. La unión de los transfectantes K562 que expresan DC-SIGN y DC derivadas de monocitos inmaduros a perlas fluorescentes revestidas con glicoconjugado se midió mediante análisis FACscan. La unión se inhibió con el anticuerpo monoclonal anti-DC-SIGN, AZN-D2. Se muestra uno de tres experimentos representativos. SD es inferior a un 2 %. Inserción: Fotografía de perlas fluorescentes acopladas a Le^x que se unen a DC que expresan DC-SIGN.

55 Figura 3. DC-SIGN se une a cuatro nuevos patógenos
a. Patógenos que consiste en *Helicobacter pylori* y *Schistosoma mansoni* ricos en Le^x , y lipoarabinomanano protegido con manosa (manLAM) de *Mycobacterium tuberculosis* y lipofosfoglicano protegido con manosa de *Leishmania mexicana*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* se revistieron y la unión de DC-SIGN-Fc recombinantes se midió con Fc de cara-anti-humano marcado con peroxidasa.
60 b. DC-SIGN se puede unir a LPS de *Klebsiella* Len1 que contiene protección de manosa, pero no se une al LPS de *Klebsiella* Len 111 que carece de una protección de manosa que indica que las cepas que contienen los carbohidratos que se unen a DC-SIGN interactúan con DC-SIGN en células dendríticas o transfectantes de DC-SIGN.

65 Figura 4. Las DC interactúan fuertemente con LPS de *H. pylori* a través de DC-SIGN. El LPS biotinilado (cepas 11637 y M1019) se revistió sobre perlas de estreptavidina y la adhesión a DC se determinó con el ensayo de

adhesión de perlas fluorescentes. La especificidad se determinó usando anticuerpos frente a DC-SIGN y el receptor de manosa. Sin embargo, la adhesión se determinó en presencia de manano y EGTA.

5 Figura 5. DC-SIGN internaliza rápidamente glicanos de Le^x a compartimentos lisosómicos. Le^x -PAA sintéticos biotinilados se añadieron a células K562 que expresan DC-SIGN o DC derivadas de monocitos inmaduros derivados durante un periodo de incubación de 30 min a 37 °C. Las células se tiñeron con anti-CD107a (LAMP-1, verde) como un marcador lisosomal y avidina-Alexa 594 para localización de Le^x después de permeabilización de las células. La colocalización de LAMP-1 y Le^x da como resultado una tinción de color amarillo.

10 Figura 6. DC-SIGN se une de forma específica a ManLAM, un componente de la pared celular de *M. tuberculosis*.
 a) DC-SIGN interactúa con varias cepas de micobacterias. La unión de DC-SIGN-Fc a micobacterias (5 * 10⁵ bacterias) se determinó mediante un ELISA específico de Fc. La especificidad se determinó midiendo la unión en presencia de anticuerpos específicos de DC-SIGN de bloqueo (AZN-D1 o AZN-D3) y manano. Para determinar la dependencia del calcio de la unión mediada con DC-SIGN-Fc se usó EGTA. La unión de ICAM-3-Fc a micobacterias también se midió para excluir la unión no específica mediante el dominio de Fc. Desviación estándar < 0,02 de DO 450. Se muestra uno de tres experimentos representativos. La unión de *Mycobacterium Smegmatis* que carece de la estructura de ManLAM no interactúa con DC-SIGN (los datos nos muestran).
 15 b) La estructura esquemática de ManLAM. El lipoarabinomanano (LAM) de *M. tuberculosis* consiste en un ancla de glicosilfosfatidilo (GPI), un núcleo de oligosacárido rico en manosa y un polímero de arabinosa ramificado que termina con protecciones de manosa (n = 0-3). AraLAM tiene una estructura similar pero no contiene la protección de manosa (ref).
 c) El lipoarabinomanano manosilado, ManLAM, al contrario que el AraLAM no manosilado, se une de forma específica a DC-SIGN. El anticuerpo anti-DC-SIGN, AZN-D1, se usó para determinar la especificidad. El ensayo de unión a DC-SIGN-Fc se realizó como se describe en la Figura 1a. Desviación estándar < 0,02 de DO 450. Se muestra uno de tres experimentos representativos.
 20 d) DC-SIGN no interactúa con AraLAM. El ensayo de unión a DC-SIGN-Fc se realizó como se describe en la Figura 1a. Se muestra uno de tres experimentos representativos.

Figura 7. La DC-SIGN celular se une fuertemente a ambas micobacterias viables y el componente micobacteriano de ManLAM a través de su sitio de unión primario.
 30 a) Los transfectantes de K562-DC-SIGN expresan niveles elevados de DC-SIGN pero carecen de expresión de los otros receptores de ManLAM informados, MR, CD11b y CD11c. Los transfectantes se generaron como se ha descrito anteriormente?. Los histogramas abiertos representan los controles de isotipo, y los histogramas rellenos indican la tinción específica del anticuerpo.
 35 b) DC-SIGN, expresado mediante K562 transfectantes, se une fuertemente a BCG de *M. bovis* intacto y al componente micobacteriano ManLAM pero no a AraLAM. La adhesión de células a los glicanos de LAM se determinó usando el ensayo de adhesión de perlas fluorescentes. La unión a micobacterias viables se determinó midiendo la unión de K562 a micobacterias conjugadas con FITC (MOI 20) usando citometría de flujo. La especificidad se determinó midiendo la unión en presencia de anticuerpos de bloqueo frente a DC-SIGN. La desviación estándar para el ensayo de adhesión de perlas fluorescentes y el era < 5 % y < 2 %, respectivamente. Se muestra uno de tres experimentos representativos.
 40 c) El resto de aminoácido Val351 no es esencial para la interacción de DC-SIGN con BCG de *M. bovis* y ManLAM, similar a gp120 de HIV-1, mientras que esencial para la unión a ICAM-3. La unión al mutante V351G DC-SIGN expresada por células K562 se midió como se describe en la Figura 2. La especificidad se determinó midiendo la unión en presencia de anticuerpos de bloqueo frente a DC-SIGN, manano o EGTA. Desviación estándar < 5 % (ensayo de adhesión de perlas fluorescentes) y < 2 % (ensayo de unión a micobacterias). Se muestra uno de tres experimentos representativos.
 45 d) Unión de DC-SIGN a componentes diferenciales de ManLAM. Las neoglicoproteínas Ara-Man, Ara-Man2, Ara-Man3 o Ara6 se revistieron sobre perlas fluorescentes y se añadieron a células que expresan DC-SIGN. DC-SIGN se une preferentemente a Man2 y Man3 como se demuestra con la unión fuerte que se puede bloquear mediante la adición de anticuerpos anti-DC-SIGN (AZN-D1).
 50

Figura 8. DC-SIGN es un receptor importante tanto para ManLAM como para micobacterias en DC.
 55 a) Las DC inmaduras expresan niveles elevados de DC-SIGN y los otros receptores de LAM informados, MR, CD11b y CD11c. Los histogramas abiertos representan el control de isotipo y los histogramas rellenos indican la tinción específica del anticuerpo.
 b) Las DC inmaduras se unen fuertemente a ManLAM a través de DC-SIGN. La unión se determinó usando el ensayo de adhesión de perlas fluorescentes. La especificidad se determinó midiendo la unión en presencia de manano, EGTA o anticuerpos de bloqueo frente a DC-SIGN (AZN-D2), MR (Clon 19), CD11b (bear-1) o CD11c (SHCL3). Desviación estándar < 5 %. Se muestra uno de tres experimentos representativos.
 60 c) DC-SIGN media la captura de BCG de *M. bovis* por DC inmaduras. La unión se determinó mediante citometría de flujo usando micobacterias conjugadas con FITC. La especificidad se determinó midiendo la unión en presencia de anticuerpos frente a DC-SIGN (AZN-D1, AZN-D2 y AZN-D3), MR (Clon 19), CD11b (bear-1) y CD11c (SHCL3). La unión también se midió en presencia de los inhibidores de lectina de tipo C, manano y EGTA, mientras que un ligando de MR conocido, manosa-BSA, se usó para determinar la contribución del receptor MR. Desviación estándar < 2 %. Se muestra uno de tres experimentos representativos.
 65

d) DC-SIGN media la captura y la internalización de BCG de *M. bovis* mediante células K562. Los transfectantes de K562 se incubaron con BCG de *M. bovis* conjugado con FITC (MOI 20). Las células se lavaron, y el FITC superficial se inactivó mediante exposición a azul de tripano. La fagocitosis se determinó por comparación del marcado de FITC antes y después de la inactivación usando citometría de flujo. Las bacterias unidas a la superficie se representan con barras abiertas, internalizadas con barras cerradas. Desviación estándar < 4 %. Se muestra uno de tres experimentos representativos.

e) Las DC inmaduras fagocitan rápidamente las micobacterias a través de DC-SIGN. La internalización se determinó como se describe en la Figura 3b. las bacterias unidas a la superficie se representan mediante barras abiertas, internalizadas con barras cerradas. Desviación estándar < 5 %. Se muestra uno de tres experimentos representativos.

Figura 9. DC-SIGN media la internalización de micobacterias capturadas y ManLAM.

a) BCG de *M. bovis* y ManLAM se internalizan con DC-SIGN en DC inmaduras y se dirige a los lisosomas. El destino de las micobacterias capturadas fue seguido de análisis de las DC inmaduras pulsadas con BCG de *M. bovis* conjugado con FITC (MOI 20) durante 2 horas usando microscopía de inmunofluorescencia (aumento de 200x). El ManLAM fue seguido de incubación de DC con ManLAM (10 mg/ml) durante 1 hora. DC-SIGN, ManLAM y CD207a/Lamp-1 se tiñeron con AZN-D1, F30.5 y H4A3, respectivamente. Se muestra uno de tres experimentos representativos.

b) ManLAM induce la regulación negativa de DC-SIGN, pero no de MR, CD11b y CD11c. Las DC inmaduras se incubaron con 15 mg/ml de ManLAM o AraLAM durante 18 horas, y a continuación la expresión de DC-SIGN se determinó mediante citometría de flujo. Se muestra uno de tres experimentos representativos.

Figura 10. Las micobacterias inducen la producción de IL-10 con DC a través de ManLAM e infección directa.

a) ManLAM induce la producción de IL-10 de DC maduras con LPS. Las DC inmaduras se incubaron con 15 mg/ml de cualquiera de ManLAM o AraLAM en presencia de LPS (10 ng/ml). La especificidad se determinó en presencia de anticuerpos de bloqueo frente a DC-SIGN (AZN-D2; 20 µg/ml). Los sobrenadantes se cosecharon después de 18 horas y la producción de IL-10 se midió con ELISA. Los valores son la media ± desviaciones estándar de determinaciones por triplicado. Se muestra uno de tres experimentos representativos.

b) La infección de BCG de *M. bovis* de DC inmaduras induce la producción de IL-10. Las DC inmaduras se infectaron con BCG de *M. bovis* (MOI 4), y el experimento se realizó como se describe en la Figura 5a. Los valores son la media ± desviaciones estándar de determinaciones por triplicado. Se muestra uno de tres experimentos representativos.

Figura 11. ManLAM inhibe la activación de DC inducida por LPS a través de la señalización de DC-SIGN.

a) ManLAM no induce la activación de las DC inmaduras. Las DC inmaduras se incubaron con ManLAM, AraLAM o LPS durante 18 horas, y la activación se determinó midiendo la expresión de CD80, CD86, CD83 y HLA-DR. Las líneas discontinuas representan controles de isotipo, las líneas delgadas indican niveles de expresión de DC inmaduras, y la línea gruesa representa DC inmaduras que se han tratado con cualquiera de LPS (10 ng/ml), ManLAM (15 µg/ml) o AraLAM (15 µg/ml). Se muestra uno de tres experimentos representativos.

b) La activación de DC inducida por LPS se bloquea con ManLAM. Las DC inmaduras se cocultivaron con LPS sólo, o junto con cualquiera de ManLAM o AraLAM durante 18 horas. Las líneas discontinuas representan controles de isotipo. Las líneas gruesas, y los valores medios de fluorescencia en los histogramas, representan los niveles de expresión después del tratamiento con LPS solo, o junto a cualquiera de ManLAM o AraLAM. Las líneas delgadas indican la presencia de anticuerpos frente a DC-SIGN durante toda la incubación. Se muestra uno de tres experimentos representativos.

Figura 12. BCG de *M. bovis* induce la maduración y ManLAM inhibe la activación de DC inducida a través de la unión a DC-SIGN.

a) BCG de *M. bovis* induce la maduración de DC inmaduras. Las DC inmaduras se incubaron con LPS o BCG de *M. bovis* viable (MOI 4, 20 y 100) durante 18 horas, y la activación se determinó midiendo la expresión de CD80, CD86, CD83 y HLA-DR. Se representa la intensidad media de fluorescencia. Se muestra uno de tres experimentos representativos.

b) La activación de DC inducida por BCG de *M. bovis* se bloquea con ManLAM. Las DC inmaduras se infectaron con BCG de *M. bovis* (MOI 4). Las células se preincubaron con 15 µg/ml de cualquiera de ManLAM o AraLAM y la expresión de los marcadores se midió después de 18 horas como se describe en la Figura 7a. La especificidad se determinó mediante la incubación previa de células con anticuerpos de bloqueo frente a DC-SIGN (AZN-D2; 20 µg/ml). Se muestra uno de tres experimentos representativos.

Figura 13. Estructuras de antígenos de carbohidrato de SEA de *S. mansoni*, anticuerpos monoclonales (Mab) que los reconocen, y reactividad de estos Mab con SEA.

La reactividad de los Mab se midió con ELISA, usando SEA revestido a una concentración de 1 µg/ml. Todos los anticuerpos, incubados a una concentración de 1 µg/ml mostraron una fuerte reacción con SEA.

Figura 14. Interacción de SEA con DC humanas inmaduras.

a) Las DC humanas inmaduras se cultivaron a partir de monocitos en presencia de GM-CSF e IL-4. A continuación, las DC se expresan cerca de niveles elevados de DC-SIGN, el MR, CD83, CD86, CD80 y HLA-DR tal como se

determina mediante análisis de FACScan.

- 5 b) DC-SIGN, expresado por DC inmaduras, muestra una unión similar a SEA al igual que para gp120 de HIV-1, un ligando de DC-SIGN definido anteriormente. La adhesión tanto a SEA como a gp120 de HIV-1 se determinó usando el ensayo de adhesión de perlas fluorescentes. Manano y de AZN-D1 de MAb anti-DC-SIGN (20 µg/ml), pero no el clon 19 de MAb anti-MR, bloquean la adhesión de SEA a las DC. Se muestra uno de tres experimentos representativos, usando anticuerpos anti-LDN para acoplar SEA a las perlas fluorescentes. Se obtienen resultados similares usando anticuerpos anti-LDN-DF (no se muestran).

Figura 15. Unión de DC-SIGN a SEA de *S. mansoni*.

- 10 DC-SIGN se une tan fuertemente a SEA como a gp120 de HIV-1, tal como se determinó con un ensayo basado en ELISA usando DC-SIGN-Fc soluble. SEA se revistieron a una concentración de 5 µg/ml, y gp120 de HIV-1 a una concentración de 1 µg/ml. La especificidad se determinó midiendo la unión en presencia del anticuerpo AZN-D1 de bloqueo anti-DC-SIGN (20 µg/ml), o EDTA (5 mM).

15 Figura 16. DC-SIGN se une fuertemente a SEA

La unión de DC-SIGN-Fc soluble a SEA a diferentes concentraciones se midió con un ELISA anti-IgG-Fc.

Figura 17. DC-SIGN se une a una subfracción de SEA

SEA se separaron mediante electroforesis en gel SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12,5 %.

- 20 a) gel de poliacrilamida con SEA (15 µg) tenido con plata para detectar todas las proteínas
b) transferencia de Western de gel de poliacrilamida después de SDS-PAGE de SEA (2 µg), usando DC-SIGN-Fc soluble para detectar glicoproteínas que se unen a DC-SIGN.

Figura 18. DC-SIGN se une a SEA fucosilado y al trisacárido Le^x α1,3-fucosilado

- 25 a) SEA se defucosilaron mediante tratamiento ácido suave o α3,4-fucosidasa. La unión de DC-SIGN-Fc soluble a SEA defucosilado (revestido a 1 µg/ml) se midió mediante un ELISA anti-IgG-Fc. El grado de defucosilación, y la integridad de glicanos no fucosilados después de los tratamientos se estableció usando diferentes MAb anti-glicano, e IgM-peroxidasa de cabra-anti-ratón para detección.
b) Inhibición competitiva de la unión de DC-SIGNFc soluble a SEA y HIVgp120 mediante mAb anti-glicano en ELISA. Los antígenos revestidos se incubaron previamente con los mAb anti-glicano antes de añadir DC-SIGNFc. La unión de DC-SIGN Fc se midió mediante un ELISA anti-IgGFc. Anticuerpos usados preferentemente SMLDN1.1 o SMFG4.1 (anti-Le^x) o SMLDN1.1 (anti-LDNF) o anti-DC-SIGN (AZN-D1, D2, AZN-D3),
c) DC-SIGN se une fuertemente a neoglicoproteínas que contienen oligosacáridos Le^x α1,3-fucosilados y LDN-F pero en menor medida a neoglicoproteínas que contienen una sola fucosa unida a "a" o a LDN-DF. Las neoglicoproteínas se revistieron a una concentración de 5 µg/ml. No se observó unión a neoglicoproteínas que contenían Galb1,4GlcNAc o GalNAcb1,4GlcNAc (LDN) (no se muestra).
- 30
35

Figura 19. Unión de SEA y Le^x a DC-SIGN y L-SIGN mutantes

- 40 a) alineamiento de la secuencia de aminoácidos de parte de los CRD de DC-SIGN (AAK20997) con los de la lectina de tipo C altamente homóloga, L-SIGN (AAK20998). La posición de las mutaciones E324A, E347Q y V351G en DC-SIGN se indican con una flecha.
b) La unión de perlas revestidas con SEA y Le^x-PAA a los transfectantes de K562 que expresan DC-SIGN de tipo silvestre y los mutantes E324A, E347Q y V351G DC-SIGN, se midió usando el ensayo de adhesión de perlas fluorescentes. Para detectar SEA, se usaron perlas fluorescentes acopladas al MAb de LDN-DF. Se muestra uno de dos experimentos representativos.
c) SEA bloquea la unión de DC-SIGN, expresado por las DC inmaduras humanas, a ICAM-3 y gp120 de HIV-1. Por el contrario, la ARNsaB no bloquea esta unión. la adhesión tanto de ICAM-3 como de gp120 de HIV-1 a DC se determinó usando el ensayo de adhesión de perlas fluorescentes. Los inhibidores estaban presentes a una concentración de 20 µg/ml.
d) La DC-SIGN, expresado por los transfectantes de K562, se une fuertemente tanto a SEA como a gp120 de HIV-1, mientras que L-SIGN, expresado por los transfectantes de K562 solamente reconoce a gp120 de HIV-1. La adhesión se determinó usando el ensayo de adhesión de perlas fluorescentes. Para detectar SEA, se usaron perlas fluorescentes revestidas tanto con anti-LDN como con anti-LDN-DF con sus resultados similares. Se muestra uno de dos experimentos representativos, usando perlas fluorescentes anti-LDN-DF.
e) Los transfectantes de K562 expresan de forma eficaz DC-SIGN, L-SIGN y los DC-SIGN mutantes diferentes, tal como se determina mediante análisis FACScan
- 45
50
55

Figura 20. Los granulocitos interactúan fuertemente con perlas revestidas con DC-SIGN, parcialmente a través de ligandos que contienen Le^x.

- 60 A. Tanto manosa así como epítomos de Lewis-X se expresan altamente en glicanos expresados mediante granulocitos
B. DC-SIGN se une fuertemente a granulocitos recién aislados. Los granulocitos recién aislados se incuban con perlas fluorescentes revestidas con DC-SIGN-Fc. La adhesión se determina mediante el ensayo de adhesión de perlas fluorescentes. La especificidad se determina midiendo la adhesión en presencia de manano, EGTA y anticuerpos frente a DC-SIGN (AZN-D1, D2 o D3), integrinas b2 (NK1-L19) y Le^x (6H3)
- 65

Figura 21. DC-SIGN-Fc tiene una afinidad elevada hacia granulocitos. La interacción de DC-SIGN con granulocitos se investiga adicionalmente por valoración de DC-SIGN-Fc y determinando la unión mediante la medida de la DC-SIGN-Fc unido usando anticuerpos Fc de cabra-anti-humano conjugados con FITC. La interacción se bloquea media con anticuerpos frente a DC-SIGN (AZN-D1), y manano y EGTA (A) y con anticuerpos anti-Le^x (3H3, B).

5
Figura 22. Una proteína de 66 kDa (CD66) es el ligando de afinidad elevada de DC-SIGN en granulocitos.
A. Los granulocitos se marcan en su superficie con biotina. El lisado celular se incuba durante una noche a 4 °C con perlas de Proteína A revestidas con DC-SIGN-Fc o anticuerpos de control frente a ICAM-2, ICAM-3 y LFA-1. Las perlas se lavan y el producto inmunoprecipitado se analiza en SDS-PAGE y se visualiza mediante autorradiografía.
10 En particular, se inmunoprecipita una proteína con un tamaño de 66kD. B. Los granulocitos expresan altamente el Le^x que contiene antígeno CD66acd y CD66d, no expresan el ligando ICAM-2 de DC-SIGN y expresan ICAM-3. C. La inmunoprecipitación de CD66acd demuestra una actividad de unión fuerte para DC-SIGNFc. Los mAb anti-CD66acd revestidos en una placa de ELISA se incubaron con un lisado de granulocitos. Después de retirar por lavado algunas proteínas no específicas, DC-SIGNFc se incubó para demostrar ligandos de afinidad elevada. La
15 DC-SIGNFc no reconoce a ICAM-3 de los granulocitos demostrando que en los granulocitos no es ICAM-3 sino CD66acd el ligando de afinidad elevada para DC-SIGN. La unión de CD66acd a DC-SIGNFc se inhibe completamente mediante la retirada de cationes con EDTA.

Figura 23. La DC-SIGN celular se unen fuertemente a la proteína CD66a específica de granulocitos.
20 Las células 293T se transfectar con pIG-CD66a-Fc, pIG-ICAM-3-Fc y pIG (simulado). Los sobrenadantes se cosechan y las perlas se revisten con las quimeras de Fc (CD66a-Fc, ICAM-3-Fc y simulado). Las DC inmaduras y las células K562 transfectar as con DC-SIGN se incuban con perlas y la adhesión se determina en presencia de anticuerpos frente a DC-SIGN e integrinas β2, y manano y EGTA.

Figura 24. Los linfocitos NK interactúan de forma específica con DC-SIGN-Fc.
25 La unión de DC-SIGN-Fc a subconjuntos de linfocitos de sangre periférica (PBL) se determina mediante citometría de flujo en presencia de anticuerpos frente a DC-SIGN. Los subconjuntos de PBL se distinguen mediante tinción con CD3 y CD56, y la adhesión se determina mediante triple tinción con DC-SIGN-Fc.

Figura 25. Los linfocitos NK interactúan de forma específica con DC-SIGN-Fc de una manera dependiente de la concentración. La unión de DC-SIGN-Fc a subconjuntos de linfocitos de sangre periférica (PBL) se determina mediante citometría de flujo en presencia de anticuerpos frente a DC-SIGN. Los linfocitos NK se detectan mediante triple tinción con CD3, CD56 y DC-SIGN-Fc. Las células CD56 dim y brillantes no difieren en la expresión de ICAM-2 o ICAM-3 lo que demuestra que la glicosilación diferencial es el resultado de la unión por afinidad elevada de DC-SIGNFc a linfocitos NK, CD56 dim.
35

Figura 26. El subconjunto de NK, CD56^{dim}CD16⁺, interactúa de forma específica con DC-SIGN-Fc. La unión de DC-SIGN-Fc a subconjuntos de NK se determina mediante citometría de flujo en presencia de anticuerpos frente a DC-SIGN. Los subconjuntos de NK se distinguen mediante tinción con CD16 y CD56, y la adhesión se determina mediante triple tinción con DC-SIGN-Fc.
40

Figura 27. Una proteína de 166 kDa e ICAM-2 se reconocen mediante DC-SIGN-Fc en linfocitos NK.
Los linfocitos NK se marcan en la superficie con yodo radioactivo. El lisado celular se incuba durante una noche a 4 °C con perlas de Proteína A revestidas con DC-SIGN-Fc o anticuerpos de control frente a ICAM-2, ICAM-3 y LFA-1.
45 Las perlas se lavan y el producto inmunoprecipitado se analiza en SDS-PAGE y se visualiza mediante autorradiografía.

Figura 28. La maduración de células DC NK está mediada con LFA-1.
Las DC inmaduras se cocultivan con linfocitos NK durante 24 horas en presencia de anticuerpos frente a DC-SIGN (AZN-D1) y LFA-1 (NKI-L19). La maduración se determina midiendo la expresión de CD80, CD83, CD86 y HLA-DR. con linfocitos NK O/N a 37 °C. Como un control, las DC se maduran con LPS (10 ng/ml).
50

Figura 29. La lisis mediada por NK de DC inmaduras depende de DC-SIGN.
Las DC inmaduras marcadas con cromo⁵² o maduras con LPS se cocultivan con linfocitos NK activados con IL-2 o no activados durante 4 horas en presencia de anticuerpos frente a DC-SIGN (AZN-D1) y LFA-1 (NKI-L19). La lisis se determina midiendo la liberación de Cr⁵².
55

Figura 30. La lisis mediada por NK de los transfectantes de K562 aumenta con DC-SIGN.
Las células K562 marcadas con cromo⁵² se cocultivan con linfocitos NK activados con IL-2 o no activados durante 4 horas en presencia de anticuerpos frente a DC-SIGN. La lisis se determina midiendo la liberación de Cr⁵².
60

Figura 31. DC-SIGN tiene una afinidad elevada para VHS-1 y VHS-2.
VHS se reviste en placas de ELISA y la unión a DC-SIGN-Fc se determina en presencia de anticuerpos frente a DC-SIGN.
65

Figura 32. DC-SIGN se une fuertemente a la glicoproteína gB de envoltura de VHS.

A. Los transfectantes de DC-SIGN se incuban con perlas revestidas con glicoproteínas de envoltura de VHS y la unión a DC-SIGN se determina en presencia de anticuerpos frente a DC-SIGN.

B L-SIGN se unen fuertemente a la glicoproteína gB de envoltura de VHS.

5 Los transfectantes de L-SIGN se incuban con perlas de glicoproteína de envoltura de VHC y la unión DC-SIGN se determina en presencia de anticuerpos frente a DC-SIGN.

Figura 33A. mSIGNR1 se une a carbohidratos que contienen manosa, similar al DC-SIGN y L-SIGN. Las células K562 que expresan DC-SIGN humano, L-SIGN humano o mSIGNR1 murino se unen de una manera similar a carbohidratos que contienen manosa - usando el ensayo de adhesión de perlas fluorescentes.

10 Figura 33B. DC-SIGN, L-SIGN y mSIGNR1 se unen de forma diferente a antígenos de Lewis. Los transfectantes que expresan DC-SIGN humano, L-SIGN humano o mSIGNR1 murino se unen de manera similar a antígeno de Lewis acoplado a perlas fluorescentes. DC-SIGN y mSIGNR1, al contrario que L-SIGN, reconocen el antígeno de Lewis X. El mSIGNR1 murino interactúa con sialil Lewis X al contrario que DC-SIGN y L-SIGN humanos.

15 Figura 33C La especificidad de carbohidrato de DC-SIGN, L-SIGN y mSIGNR1 es diferente. El antígeno de Lewis X no es reconocido por L-SIGN, mientras que la DC-SIGN humano y mSIGNR1 si lo es. El mSIGNR1 reconoce a sialil Lewis X al contrario que DC-SIGN y L-SIGN. Tanto la DC-SIGN humano como el mSIGN1 murino se unen a sialil Lewis A, al contrario que L-SIGN.

20 Figura 34. DC-SIGN, L-SIGN y mSIGNR1 se unen a manano derivado de levadura, virus E1/E2 de la Hepatitis C, gp120 de HIV-1 y ManLAM de micobacterias. Los ligandos patogénicos se revistieron en perlas fluorescentes y la adhesión se midió usando el ensayo de adhesión de perlas fluorescentes con los transfectantes de K562. La unión de Gp120 a DC-SIGN, L-SIGN y mSIGNR1 se inhibió usando el carbohidrato derivado de levadura, manano, lo que demuestra que estas lectinas de tipo C también se unen a manano derivado de levadura.

Figura 35. DC-SIGN se une de forma específica a proteínas de envoltura de VHC.

30 A. DC-SIGN se une tanto a la levadura Hansenula como proteínas de envoltura de VHC producidas por células de mamífero. La interacción de DC-SIGN con las proteínas E1 y E2 de envoltura de VHC (2 mg/ml) producidas por la levadura Hansenula o células de mamífero infectadas con virus Vaccinia recombinante se sometió al ensayo en un ELISA basado en Fc. La especificidad de la unión se confirmó usando el anticuerpo AZN-D1 de bloqueo específico para DC-SIGN (50 mg/ml), manano (100 mg/ml) o el agente quelante de calcio, EGTA (5 mM).

35 B. La interacción de DC-SIGN con E1 y E2 de VHC depende de la concentración. Los E1 y E2 producidos por células de mamífero se valoraron (0-16 o 14 mM de resp.) y la unión a DC-SIGN-Fc se sometió a ensayo como se ha descrito anteriormente. Para bloquear la interacción de forma específica se usó AZN-D1 (50 mg/ml).

40 C. DC-SIGN tiene una afinidad similar hacia E1, E2 y gp120. Los E1 y E2 producidos por células de mamífero (10 nM) y gp120 (2 nM) se revistieron y la unión a DC-SIGN-Fc se sometió a ensayo como se ha descrito anteriormente. El manano se valoró (0-1000 mg/ml) para bloquear la interacción. La unión se expresó como porcentaje de la unión sin bloqueo.

45 D. La DC-SIGN que se une a E1, E2 y gp120 depende igualmente del calcio. Los E1 y E2 producidos por células de mamífero (10 nM) y gp120 (2 nM) se revistieron y la unión a DC-SIGN-Fc se sometió a ensayo como se ha descrito anteriormente en presencia de una cantidad variable de calcio (0-5 mM). la unión se expresó como porcentaje de unión con calcio 5 mM.

50 Figura 36. Las proteínas de envoltura de VHC se unen mediante DC-SIGN y L-SIGN celulares. Los transfectantes de K562 expresan niveles similares de DC-SIGN y L-SIGN. B Los DC-SIGN y L-SIGN celulares se unen a ambas glicoproteínas E1 y E2 de envoltura. Las células K562 transfectadas con DC-SIGN y L-SIGN se usaron para medir la unión a proteínas de envoltura de VHC con el ensayo de adhesión de perla revestida con fluorescencia. C El mutante Val351 de DC-SIGN se une a ambas proteínas E1 y E2 de envoltura de VHC. El V351G de DC-SIGN que se une a perlas revestidas con las glicoproteínas E1 y E2 se investigó y la especificidad se determinó mediante el bloqueo de la interacción con el anticuerpo AZN-D2 específico de DC-SIGN o el agente que quelante de ión calcio, EGTA. D. El análisis mutacional demuestra que algunos aminoácidos similares dentro de la región CRD de DC-SIGN están implicados en el reconocimiento de VHC y HIV-1 y que los mismos también están implicados en la unión a ICAM-3.

55 Figura 37. La ruta de internalización de DC-SIGN depende del fondo celular. Un DC-SIGN y L-SIGN expresado por transfectantes de K562 y THP-1 se unen a las VLP de VHC del mismo modo. La unión de las VLP E1/E2 del VHC los transfectantes K562 y THP-1 tanto con DC-SIGN como con L-SIGN se midió usando el ensayo de adhesión de perlas fluorescentes. B-E El VHC unido a DC-SIGN se dirige a los endosomas tempranos (transferrina +) en células THP-1, al contrario que en las lisosómicas (LAMP-1+) que se dirigen a células K562. Las células K-562 (B y C) y THP-1 (D y E) que expresan DC-SIGN o L-SIGN se incubaron durante una noche con las VLP del VHC. El VHC se detectó usando un anticuerpo anti-VHC humano y un anticuerpo secundario marcado con (FITC) fluorescente. El direccionamiento intracelular se determinó mediante tinción de los compartimentos endosómicos con un anticuerpo de ratón para el LAMP-1 específico de lisosomas/endosomas tardíos y anticuerpo secundario marcado con (Alexa Fluor 594) fluorescente (B, D), o mediante la coincubación de las células durante 15 minutos con transferrina marcada con Alexa Fluor 594 que se transporta de forma específica a los endosomas tempranos y funciona como un

marcador (C, E). Las células se analizaron mediante microscopía de fluorescencia.

Figura 38. Las células dendríticas se unen fuertemente a E1 y E2 del VHC a través de DC-SIGN.

A Las DC inmaduras expresan niveles elevados de DC-SIGN. Se aislaron células dendríticas derivadas de monocitos como se describe en materiales y métodos. La expresión de DC-SIGN se midió mediante tinción de FACS con el anticuerpo AZN-D2 específico para DC-SIGN. B, C Las DC inmaduras y las DC maduras se unen fuertemente a las proteínas E1 y E2 de envoltura del VHC, y a las VLP de E1/E2 del VHC mixtas a través de DC-SIGN. Las DC inmaduras (B) y maduras con LPS (C) que se unen a proteínas de envoltura del VHC se determinó mediante un ensayo de adhesión de perlas fluorescentes. La especificidad se determinó con un anticuerpo AZN-D2 anti-DC-SIGN (50 mg/ml), manano (100 mg/ml), EGTA (10 mM), y anticuerpo receptor anti-manosa (clon 19) (50 mg/ml).

Figura 39. La DC-SIGN en las iDC dirige a las VLP del VHC hacia endosomas tempranos. A Las células dendríticas inmaduras se incubaron con las VLP del VHC (30 mg/ml) durante 4 horas o durante una noche. El VHC se detectó con un anticuerpo anti-HVC humano y un anticuerpo secundario marcado con FITC. El direccionamiento intracelular se determinó mediante tinción de los compartimentos endosómicos con un anticuerpo de ratón con respecto al LAMP-1 específico de lisosomas/endosomas tardíos o el marcador EEA-1 específico de endosomas tempranos y un antipapa secundario marcado con Alexa Fluor 594, o mediante la coincubación de las células durante 15 minutos con transferrina marcada con Alexa Fluor 594 que se transporta de forma específica a los endosomas tempranos. B Las células dendríticas inmaduras se incubaron con las VLP del VHC (30 mg/ml) durante 4 horas o durante una noche a 37 °C o 4 °C. El VHC se detectó tal como se ha descrito para la figura 5A. La localización de DC-SIGN se determinó con el anticuerpo AZN-D2 específico para DC-SIGN y un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 594.

Figura 40 La DC-SIGN en las iDC dirige su antígeno de Lewis X ligando a endosomas/lisosomas tardíos. Las células dendríticas inmaduras se incubaron con Lewis X (10 mg/ml) durante 4 horas. El direccionamiento intracelular se determinó mediante tinción de los compartimentos endosómicos con un anticuerpo de ratón para el LAMP-1 específico de lisosomas/endosomas tardíos o mediante coincubación de las células durante 15 minutos con transferrina marcada con Alexa Fluor 594 que se transporta de forma específica a los endosomas tempranos. Las células se analizaron mediante microscopía de fluorescencia.

Figura 41. El VHC interactúa con L-SIGN que expresa células endoteliales sinusoidales de hígado humano (LSEC) *in situ*. (A) L-SIGN se expresa por las LSEC humanas, tal como se determinó mediante la tinción de tejido hepático con un anticuerpo específico de L-SIGN. (B) La unión de las VLP del VHC mediante tejido hepático se determinó por incubación de secciones de hígado con las VLP del VHC durante 2 horas a 37 °C. La unión al VHC se detectó usando un anticuerpo anti-VHC de ratón y un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 594. (C) La unión de VLP del VHC a las LSEC se bloqueó con el agente quelante de calcio, EGTA.

Figura 42. Algunos antígenos del grupo sanguíneo de Lewis y algunas de sus estructuras relacionadas se unen a DC-SIGN. (a) Antígenos del grupo sanguíneo de Lewis expresados por *H. pylori*. (b-c) Los carbohidratos, que representan antígenos de grupo sanguíneo o sus subestructuras, conjugados con poliacrilamida (b), o ceramida (c), se revistieron y la unión de la DC-SIGN-Fc recombinante se midió usando el ELISA de DC-SIGN-Fc.

Figura 43. La unión de *H. pylori* depende de la expresión del antígeno de Lewis. (a-c) Se revistieron mutantes (a), cepas (b) y variantes de fase (c) de α 3-fucosiltransferasa de *H. pylori* y la unión de la DC-SIGN-Fc recombinante se midió después de incubación con Fc de cabra-anti-humano marcado con peroxidasa. El *H. pylori* se revistió y se incubó con anticuerpos específicos para antígenos de Lewis tal como se indica y se determinaron sus serotipos después de incubación con inmunoglobulinas anti-ratón marcadas con peroxidasa.

Figura 44. La variación de fase de LPS en *H. pylori* se produce *in vivo*.

(a) Se detectaron variantes de J223 de fase positiva para Lex/y mediante transferencia de colonias con mAb específicos para los antígenos de Lewis indicados, después de un breve tiempo de cultivo directamente a partir de la biopsia, seguido de un solo pasaje en fase fluida y distribución sobre medios sólidos. (b) La secuenciación del tracto C se realizó para determinar el estado "activado" y "desactivado" de los genes *futA* (HP0379) y *futB* (HP0651). El mutante J223.3 *futB* se genera mediante transformación natural con constructo que contiene un casete marcador de resistencia a cloramfenicol en el gen HP0651, se formó serotipo tal como se indica para J223. (c) país que inicia consecuencias de la longitud del tracto C para la expresión funcional de *futA* y *futB*.

Figura 45. La DC-SIGN se expresa en las DC gástricas y es el receptor principal para *H. pylori* positivo para Le.

(a) Una sección del tejido del estómago se fijó y se tiñó con anticuerpos anti-DC-SIGN. Aumento original de x 20. Las flechas indican las células de tipo DC positivas para DC-SIGN en la lamina propia. (b-d) Las DC derivadas de monocitos (b), las DC derivadas de monocitos y macrófagos de RAW (c) o células K-562 transfectadas con DC-SIGN (d) se incubaron con J223.3 o J223.8 de *H. pylori* marcados con FITC y la unión se analizó usando citometría de flujo. En b y d, las células se incubaron previamente con anticuerpos anti-DC-SIGN, anticuerpos receptores (MR) de manano, EDTA, o anti-manosa.

Figura 46. La unión de *H. pylori* a induce un aumento de la producción de las citoquinas IL-10 e IL-12 dependiente

de DC-SIGN, pero ningún cambio en IL12p70.

(a) Las DC se incubaron con J223.3 o J223.8 de *H. pylori* con una multiplicidad de infección (M.O.I.) de 20 en presencia o ausencia de anticuerpos anti-DC-SIGN durante 1 h, se lavaron y se cultivaron durante 20 h. El sobrenadante se cosechó y la cantidad de IL-10 e IL-12p40 se analizó por ELISA.

(b) Después del cocultivo de DC con J223.3 o J223.8 de *H. pylori*, las células se incubaron con fibroblastos de J558 transfectados con CD40L en ausencia o presencia de IFN- γ durante 24 h. El sobrenadante se cosechó y la cantidad de IL-12p70 se analizó por ELISA.

Figura 47. La unión de *H. pylori* a DC-SIGN induce el sesgo de los linfocitos T sin tratamiento previo con respecto a Th2.

Después de incubación previa con anticuerpos anti-DC-SIGN, las DC se incubaron con J223.3 o J223.8 de *H. pylori* a una M.O.I. de 10 durante 48 h, se grabaron y posteriormente se cocultivaron con linfocitos CD45RA+CD4+ T altamente purificados. Los linfocitos T quiescentes se volvieron a estimular con PMA e ionomicina e IL-4 e IFN- γ y se analizaron en una base de una sola célula mediante citometría de flujo intracelular.

Figura 48: Los lactobacilos inducen maduración parcial de DC.

Las DC inmaduras (iDC) se generaron tal como se ha descrito. A) la maduración se indujo mediante la adición de LPS (100 ng/ml), 107 bacterias, LPS más MF (rIL-1b (25 ng/ml) y rTNFa (50 ng/ml)), o MF más 1.107 bacterias. Después de 48 h, las DC maduras (mDC) se cosecharon, se lavaron y (A) la expresión de la superficie de CD86, HLA-DR y CD83 se analizó por citometría de flujo. (B) Las DC maduras (2.104 células/pocillo) se estimularon con células de fibroblastos de ratón que expresan CD40L de ratón (células J558, 2x104 células/pocillo) para inducir la producción de IL-12, IL-10 e IL-6. Después de 24 h, los sobrenadantes se recogieron y la producción de IL-12p70, IL-10 e IL-6 se midió con ELISA.

Figura 49: *L. reuteri* y *L. casei* inducen el desarrollo de linfocitos T reguladores mediante la modulación de la función de DC.

La generación de iDC y las condiciones de maduración se describen en la leyenda de la figura 16. (A) Las DC maduras (5x103 células/pocillo) se cocultivaron con linfocitos T sin tratamiento previo auxiliares (células Th) (2x104 células/pocillo) y superantígeno SEB (10 pg/ml). Después de 12 días, las producciones de IFN- γ e IL-4 por célula se analizaron mediante tinción de FACS intracelular después de una estimulación con PMA/ionomicina durante 6 h, las últimas 5 h en presencia de Brefeldina A. (B) Las DC maduras (2,5x103 células/pocillo) se cocultivaron con células Th sin tratamiento previo (5x104 células/pocillo). La proliferación celular se evaluó mediante la incorporación de [3H]-TdR marcado con radiactividad después de un pulso con 13 KBq/pocillo durante las últimas 16 h del cultivo de 6 días después de estimulación, tal como se mide mediante espectroscopía de centelleo líquido. (C) Las células Th sin tratamiento previo se estimularon como se ha descrito en la parte A. Después de 12 días, las células sometidas a ensayos se marcaron con fluorescencia con PKH, y se estimularon con concentraciones subóptimas de concentraciones anti-CD3 (1:5000) y anti-CD28 (1:2000). Después de incubación durante una noche, los linfocitos T diana marcados con (CFSE) fluorescente (linfocitos CD4+ T periféricos), se añadieron en una proporción de 1:1 (2,5x104 cada uno). Después de 5 días, la tinción con PKH y CFSE de las células se analizó mediante citometría de flujo. El perfil de CFSE sombreado en color gris representa la condición del ensayo (bacterias: 105), mientras que la superposición indica la proliferación en presencia de células de ensayo de control (MF/LPS). La figura es una representación con respecto a 7 experimentos independientes. (D) La intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células diana marcadas con CFSE cocultivadas en presencia de células de ensayo de control (MF/LPS) se ajustó a un 100 %, que representa la proliferación máxima. La MFI de los linfocitos T diana cocultivados con otras células de ensayo se comparó con este valor, calculando la proliferación relativa. Los resultados se expresan como los porcentajes medios \pm ETM de 4-7 experimentos independientes (Cordicepina: 25 - 12,5-6,25 μ g/ml). Los datos se analizaron para significancia estadística usando ANOVA seguido de ensayo de comparación múltiple de Bonferroni. * P < 0,05, ** P < 0,01.

Figura 50: Ninguna actividad de TLR con Lactobacilos.

(A) Se sembraron células HEK 293 transfectar as de forma estable con cualquiera de TLR2 o TLR4 a 0,2 x 106 peludas/pocillo y se estimularon con 107 bacterias/ml o TNFa. Después de 24 horas, se recogió el sobrenadante y el contenido de IL-8 se analizó por ELISA. (B) Las células HEK 293 se transfectar de forma transitoria con TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 + MD2, TLR6, TLR7 y TLR9 humanos, junto con un constructor indicador de ELAM-luciferasa y se estimularon con 107 bacterias o TNFa. La actividad de luciferasa se determinó 6 h después de la estimulación.

Figura 51: *L. reuteri* y *L. casei* se unen a DC-SIGN en moDC.

(A). Las DC inmaduras se incubaron con bacterias marcadas con FITC. Después de lavado, las células se analizaron mediante citometría de flujo. (B) Se usó un protocolo similar, como se ha descrito la parte A, para analizar bacterias que se unen a K562 transfectadas con DC-SIGN o células K562 sin transfectar. Se realizaron incubaciones previas con cualquiera de TSM + BSA al 0,5 %, EDTA o anti-DC-SIGN (AZN-D1 y AZN-D2, 20 μ g/ml). (C) La unión a DC se realizó como se describe en la parte A. Se realizaron incubaciones previas con cualquiera de TSM + BSA al 0,5%, anti-DC-SIGN (AZN-D1 y AZN-D2, 20 μ g/ml), anti-MR, Manano o metilglucósido.

Figura 52: El bloqueo de la interacción de DC-SIGN con *L. reuteri* y *L. casei* elimina el cebado para el desarrollo de

linfocitos T reguladores. La generación de iDC se describe en la leyenda de la figura 1. Las DC inmaduras se incubaron previamente (30 min, 37 °C) con cualquiera de control de isotipo Ab, anti-DC-SIGN (AZN-D1; 20 µg/ml) o Manano. A partir de ese momento, la maduración se realizó como se describe en la leyenda de la figura 16. La inducción de la actividad celular supresora se analizó como se describe en la leyenda de la figura 17.

5
10
15
Figura 53. Los Neutrófilos Mononucleares Polimórficos (PMN) expresan el ligando Lewisx de DC-SIGN y se unen con afinidad elevada al DC-SIGN recombinante. A. Los glicoconjugados de poliacrilamida de Lewisx y de Lewisx sialilado se revistieron y la adhesión de DC-SIGN-Fc se midió con Fc de cabra anti-humano marcado con peroxidasa en ELISA de DC-SIGN-Fc. B. La expresión de Lewisx se determinó en PMN marcado para CD16 para discriminar entre neutrófilos CD16+ y eosinófilos CD16-. C. La adhesión de perlas revestidas con ICAM-3-Fc o DC-SIGN-Fc a PMN se evaluó usando citometría de flujo. La especificidad de la adhesión se obtuvo usando anticuerpos del bloqueo anti-DC-SIGN (AZN-D1, 20 mg/ml), manano (50 mg/ml), o EGTA (10 mM). D. La valoración de DC-SIGN-Fc con respecto a PMN revela una unión de afinidad elevada de DC-SIGN a PMN. E. Unión de la concentración óptima de DC-SIGN-Fc (10 mg/ml) a PMN marcado para el marcador CD16 neutrófilos. Para evaluar la especificidad del bloqueo se usaron anticuerpos anti-DC-SIGN (AZN-D1, 50 mg/ml).

20
25
30
Figura 54. El CEACAM1 expresado en PMN es un ligando de DC-SIGN y se une a través de sus restos de Lewisx. A. El lisado de PMN completo se analizó en un gel de poliacrilamida al 7 % durante 1,5 h a 120 V, se transfirió en transferencia de nitrocelulosa, y se hizo tinción con DC-SIGN-Fc, anti-CEACAM1 (anti-CD66) o anticuerpos anti-Lewisx (3 mg/ml) y anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina. B. Se usaron perlas de proteína A (protA) revestidas con DC-SIGN-Fc para inmunoprecipitar ligandos de DC-SIGN de PMN con superficie biotinilada. Los inmunoprecipitados se desarrollaron en gel, se transfirieron en transferencia, y se hizo tinción con estreptavidina conjugada con peroxidasa. C. El CEACAM1 inmunoprecipitado a partir de PMN usando perlas de proteína G (protG) revestidas con anticuerpos anti-CEACAM1 se sometieron a tinción en transferencia usando DC-SIGN-Fc y anticuerpos de cabra anti-humano conjugados con fosfatasa alcalina. D. La incubación con la enzima α 1-3,4 fucosidasa (5 mU/ml) durante 3 días a 37 °C elimina el epitopo de Lewisx en CEACAM1 derivado de PMN. E. Usando un sistema basado en ELISA, la adhesión de DC-SIGN-Fc a PMN CEACAM1 se midió y se comparó con el mismo después de tratamiento con α 1-3,4 fucosidasa. F. Los anticuerpos dirigidos frente a Lewisx (20 mg/ml) bloquean la adhesión de DC-SIGN-Fc a CEACAM1 capturado a partir de PMN usando anticuerpo anti-CEACAM1 en ELISA de adhesión.

35
40
Figura 55. La DC-SIGN celular expresado en los transfectantes de K562 y las DC inmaduras se unen al CEACAM1 nativo de PMN. A. Las perlas fluorescentes revestidas con CEACAM1 de PMN se incubaron con los transfectantes de K562 que expresan DC-SIGN de tipo silvestre o DC-SIGN mutante que presenta una sola sustitución de aminoácidos en el dominio de lectina de tipo C crucial para la unión al ligandos. La adhesión de perlas se midió usando análisis FACS. B. Se determinó la adhesión de perlas revestidas con CEACAM1 a DC inmaduras. La especificidad de la adhesión se evaluó usando anticuerpos de bloqueo anti-DC-SIGN (20 mg/ml), manano (50 mg/ml), o EGTA (10 mM).

45
50
Figura 56. DC-SIGN está implicado en la formación de grupos de DC y PMN. A. Los PMN marcados con CFSE (verde) se incubaron con K562 marcado con HE fluorescente, K562-DC-SIGN, e DC inmaduras (rojo) durante 15 min a 37 °C. Se usaron anticuerpos anti-DC-SIGN (AZN-D1 y AZN-D2, 10 mg/ml) para determinar la implicación de DC-SIGN. La formación de grupos celulares se visualizó usando microscopía de fluorescencia y se realizaron fotografías representativas. B. Usando el análisis de FACS, la formación de grupos celulares se siguió en el tiempo mediante puntuación del porcentaje de K562 o K562-DC-SIGN que tiene PMN unido. C. La adhesión de PMN a DC inmaduras se cuantificó mediante citometría de flujo.

55
60
Figura 57. Localización de PMN y DC en mucosa de colon de pacientes con enfermedad de Crohn. A. Láminas de tejido intestinal inflamatorio de pacientes con enfermedad de Crohn se sometieron a doble tinción para los marcadores Lewisx de PMN (6H3, fluorescencia de color verde) y CEACAM1 (CLB-gran/10, fluorescencia de color azul), B. Para CEACAM1 (CLB-gran/10, fluorescencia de color verde) y la DC-SIGN marcador de DC (CSR, fluorescencia de color rojo), o C. Para Lewisx (6H3, fluorescencia de color verde) y DC-SIGN (CSR, fluorescencia de color rojo). El anticuerpo anti-CEACAM1 produce tinción de fondo en criptas del colon, debido probablemente a la reacción cruzada con CEA que se expresa en células epiteliales colónicas.

65
Figura 58. PMN activa las DC inmaduras a través de la unión a DC-SIGN. A. La maduración de DC mediante reposo o PMN se determina midiendo la expresión del marcador CD86 de maduración de DC. La maduración se puede inhibir con anticuerpos anti-DC-SIGN (AZN-D1). La maduración de las DC con los PMN se comparó con la maduración de las DC con LPS o *E. coli*. B. La producción de citoquinas de IL-12 y TNF α se analizó después de interacción de PMN DC, y depende de la unión a DC-SIGN ya que los anticuerpos frente a DC-SIGN bloquean la inducción de citoquinas.

Figura 59. DC-SIGN se une tanto a CD11 como a CD66a-d que expresan Lewis X en PMN.
A La captura de CD11b y CD66acd a partir de lisado de PMN usando anticuerpos específicos reveló la presencia de antígenos de Lewis X en estas moléculas de la membrana celular
B La captura de CD11b y CD66acd de lisado de PMN y el acoplamiento a perlas fluorescentes reveló que en

particular en CD11b y CD66acd derivados de PMN interactuaba fuertemente con transfectar es que expresan DC-SIGN lo que indica que DC-SIGN se une a CD11b y CD66acd derivados de PMN.

C El CD11b/CD18 capturado y el CD66 fuera del lisado de PMN demuestra una unión por afinidad elevada con DC-SIGNFc como se demuestra en ELISA de DC-SIGN Fc.

- 5 D Los estudios de inmunotransferencia demuestran que DC-SIGNFc interactúa de forma específica con CD66acd y CD11b de PMN cuando se inmunoprecipita (IP) usando anti-CD66acd (calle 9) y mAb de CD11b (calle 10) fuera de un lisado de PMN. Las proteínas de la superficie celular están biotiniladas y los PMN están lisados. Calle 1. Control negativo que usa Fc de ICAM-3 para capturar mediante proteínas de IP. La detección se realiza con estreptavidina marcada con peroxidasa. Calle 2. La DC-SIGN-Fc se usa para capturar ligandos biotinilados de a partir del lisado; son visibles dos bandas de proteína, la banda superior consiste en CD11b y CD66a, mientras que la banda inferior consiste en CD18. Calle 3. Control negativo; no se inmunoprecipita ninguna banda con anticuerpos anti-DC-SIGN. Calle 4, IP con anticuerpos frente a CD66acd; es visible una banda débil que contiene CD66a. Calle 5, IP de CD11b; son visibles dos bandas; la banda superior es CD11c y la banda inferior es CD18m, que se coimmunoprecipita con CD11c. Calle 6. IP con ligandos de DC-SIGN y detección con anti-CD66acd; CD66a se captura con DC-SIGN Fc. Calle 7. IP con ligandos de DC-SIGN y detección con anti-CD11b; CD11b se captura con DC-SIGN Fc. Calle 8. Control negativo, IP con anticuerpos anti-DC-SIGN y detección con DC-SIGN-Fc. Calle 9. IP con anti-CD66acd y detección con DC-SIGN Fc; CD66a se une con DC-SIGN en transferencia. Calle 10. IP con anti-CD11a y detección con DC-SIGN Fc; CD11a se une con DC-SIGN en transferencia.

20 Figura 60

DC-SIGN se une a estructuras de Lewis X en PMN en la forma CD11b.

Los estudios de inmunoprecipitación (IP) revelaron que la unión de DC-SIGN-Fc a CD11b se anula cuando CD11b se trata con α -1, 3,4 Fucosidasa que elimina el resto de fucosa presente en Lewis X (Calle 7 y 8)

25 Figura 61

DC-SIGN se une a células tumorales que expresan el antígeno tumoral CEA (CD66e), a través de la interacción de DC-SIGN con CD66e.

- A. DC-SIGNFc reconoce antígenos tumorales en varios carcinomas y adenocarcinomas de mama. La unión se puede bloquear con mAb anti-DC-SIGN
- 30 B. la línea SW948 de células tumorales interactúa con células que expresan DC-SIGN y con las DC y la adhesión celular se puede bloquear con anticuerpos anti-DC-SIGN (AZN-D1), lo que indica una función de DC-SIGN para interactuar con una estructura celular en células tumorales
- C. DC-SIGN-Fc se une a CD66e inmunoprecipitado (CEA). La inmunoprecipitación con anti-CD66e (anti-CEA) de lisado de células tumorales SW948 biotiniladas en la superficie celular muestra que DC-SIGN-Fc se une al antígeno tumoral CEA (calle 5).

Figura 62

DC-SIGN reconoce a Lewis X y Lewis Y en CD66e de células tumorales.

- A. CD66e de la línea SW948 de células de tumor expresa estructuras s de carbohidrato de Lewis X y Lewis Y determinadas usando anticuerpos específicos.
- B. El CD66e capturado de lisado de SW948 se une mediante DC-SIGN-Fc
- C. La DC-SIGN-Fc captura a CD66e de un lisado de SW948 tal como se detecta con un anticuerpo específico anti-CD66e.
- 45 D. Los estudios de inmunoprecipitación (IP) revelaron que la unión de DC-SIGN-Fc a CD66e se anula cuando CD66e se trata con α -1, 3,4 Fucosidasa que elimina el resto de fucosa presente en Lewis X, Y (Calle 3 y 4).

Figura 63.

Figura esquemática de diferentes mutantes de *Neisseria Meningitidis* con diferentes restos de carbohidrato con extremo vertical en sus estructuras de LPS.

- 50 Figura 64. DC-SIGN se une a los mutantes IgtB y rfaF de *Neisseria Meningitidis*. Los mutantes de *Neisseria Meningitidis* diferentes se investigan por sus interacciones usando diferentes moléculas de Fc de lectina de tipo C (DC-SIGN-Fc, DCIR-Fc, BCDA-2-Fc, MGL-Fc Dectina-1B-Fc) usando el ensayo de ELISA para Fc.

55 Figura 65

Las DC inmaduras se unen fuertemente al mutante IgtB de *Neisseria Meningitidis* a través de DC-SIGN. Solamente el mutante fluorescente IgtB de *Neisseria*, que contiene un GlcNAc con extremo vertical, se une fuertemente a DC, tal como se determina con citometría de flujo, y la unión se puede bloquear completamente con anticuerpos anti-DC-SIGN lo que indica que DC-SIGN está implicado en la captura de IgtB de *Neisseria*. La manosa-BSA y el manano inhiben parcialmente la interacción.

Figura 66.

- 65 DC-SIGN-Fc se une fuertemente a células CHOP8 que sobreexpresan GlcNAc, lo que indica que DC-SIGN también se une a restos de GlcNAc en autoglicoproteínas (CHOP8) y en patógenos tales como *Neisseria* (Figura 33).

Ejemplos

5 Los ejemplos que no se refieren a un glicoconjugado que comprende un antígeno tumoral y un antígeno de Lewis x no sialilado no forman parte de la invención

Métodos

10 *Anticuerpos y proteínas.* Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales (Mab): anti-CD107a (Lamp-1; MabH4A3, BD Pharmingen), anti-MR (Clon 19, BD Pharmingen), CD11b (bear-1)²⁵, CD11c (SHCL3)²⁶, anti-DC-SIGN (AZN-D1, AZN-D2¹⁴, CSRD¹⁰, CD11a de bloqueo (NKI-L15), anti-ICAM-1 (Rek-1), anti-ICAM-2 (12A2), y anti-ICAM-3 (AZN-IC3/1, icr-2), CD18 de activación (KIM185) y los anticuerpos, conjugados con PE/FITC, CD25, CD69, CD80, CD86, HLA-DR (BD Pharmingen), y CD83 y CD56 (Beckman Coulter). CD3 y CD16 conjugados con biotina (BD Pharmingen). CLB-T4 (α CD4) fue un detalle generoso de René van Lier. MEM-157 (α CD16) y MEM-97 (α CD20) fueron proporcionados amablemente por Vaclav Horejsi. Los mAb CBR-IC-1/3 de ICAM-1, mAb CBR-IC-2/1 de ICAM-2, y mAb CBR-IC-3/2 de ICAM-3 se obtuvieron a través del Laboratorio Antigénico de Diferenciación de Leucocitos Humanos. Se usaron varios anticuerpos monoclonales anti-glicano (MAB): el MAb 114-5B1-A¹⁶ anti-LDN-DF, el MAb SMLDN1.1¹⁷ anti-LDN, el MAb SMLDNF1¹⁰ anti-LDN-F y el MAb CB10²⁷ anti-Le^x, los mAb SMLDN1.1 y SMFG4.1 y 6H3 anti-Lex (anti-Lex). El mAb (CLB-gran/10) se usó para teñir e inmunoprecipitar CD16.

20 La neoglicoproteína HSA-Le^x, que contiene aprox. 20-25 cadenas de oligosacárido por molécula de HSA, era de Isosep AB, Tullinge, Suecia. De la neoglicoproteína BSA-LDN-DF (aprox. 12 cadenas de oligosacárido por molécula de BSA), y BSA-LDN-F (aprox. 3-4 oligosacáridos por molécula de BSA), se sintetizaron por vía enzimática tal como se describe en van Remoortere et. al¹⁶, y Nyame et. al¹⁷, respectivamente. La Le^x-PAA-biotina, que contiene Le^x acoplado de forma polivalente a poli(acrilamida) biotinilada era de Syntesome, Munich, Alemania.

30 El manano purificado de *Saccharomyces cerevisiae* (50 μ g/ml) y gp120 recombinante (0,50 μ g/ml) se obtuvieron en Sigma y en la Aidsresource Foundation, respectivamente. El lipoarabinomano protegido con manosa (manLAM) purificado de *Mycobacterium tuberculosis*, y el LAM (araLAM) no protegido de *M. smegmatis* proporcionados amablemente por el Dr. J. Belisle, Universidad del Estado de Colorado a través de NIH, NIAID contract NO1 AI-75320. Los antígenos solubles de huevo (SEA) fueron proporcionados amablemente por el Dr. A. K. Nyame, Oklahoma University HSC, USA). El lipofosfoglicano purificado de *Leishmania mexicana* fue donado amablemente por el Dr. M Wiese, Bernard Nocht Inst. Tropical Medicine, Hamburgo, Alemania. El lipopolisacárido purificado de *Helicobacter pylori* se obtuvo en M. Monteiro, NRC, Ottawa, Canadá. Una sonicación de células bacterianas de un aislado clínico de *M. tuberculosis* fue donado por A. Kolk, KIT, Royal Trop. Inst, Amsterdam. Los aislados clínicos de *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* se obtuvieron en VUMC Hospital, Amsterdam. Los glicoconjugados sintéticos se obtuvieron en Syntesome, Munich, Alemania, y estaban formados por mono- y oligosacáridos unidos de forma polivalente a un vehículo de poli(acrilamida) biotinilada, PM 40.000.

40 *Ensayo de adhesión a DC-SIGN-Fc soluble.* La DC-SIGN-Fc consiste en la porción extracelular de DC-SIGN (restos de aminoácidos 64-404) fusionada al extremo C-terminal de un fragmento de IgG1-Fc humano. La DC-SIGN-Fc se produjo en células K1 de Ovario de Hámster Chino mediante cotransfección de Fc de DC-SIGN-Sig-plgG1 (20 μ g) y vector pEE14 (5 μ g). Las concentraciones de DC-SIGN-Fc en el sobrenadante se determinaron mediante un ELISA de Fc anti-IgG1. El ensayo de unión a DC-SIGN-Fc se realizó como sigue a continuación. Los glicoconjugados y micobacterias sonicadas se revistieron sobre placas de ELISA a 5 μ g/pocillo; las células bacterianas intactas se revistieron a 5x10⁷/ml; el revestimiento se produjo durante 18 horas a temperatura ambiente, seguido de bloqueo con BSA al 1 % durante 30 min, a 37 °C en TSM (Tris-HCl 20 mM a pH 7,4 que contiene NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM y MgCl₂ 2 mM). Se añadió DC-SIGN-Fc soluble (aprox. 2 μ g/ml en tampón de TSM) y la adhesión se realizó durante 120 min. a TA. La DC-SIGN-Fc sin unir se retiró por lavado y la unión se determinó mediante un ELISA de an Fc anti-IgG1 usando un conjugado de peroxidasa de Fc anti-humano de cabra. La especificidad se determinó en presencia de cualquiera de 20 μ g/ml de anticuerpos de bloqueo, 50 μ g/ml de manano o EGTA 5 mM.

55 *Células.* Las DC inmaduras se cultivaron a partir de monocitos en presencia de IL-4 y GM-CSF (500 y 800 U/ml, respectivamente; Schering-Plough; Bruselas, Bélgica)²⁸. En el día 7, el fenotipo de las DC cultivadas se confirmó mediante análisis de citometría de flujo. Las DC expresaba niveles elevados de la clase I y II de MHC, α M β 2 (CD11b), α X β 2 (CD11c) y ICAM-1, niveles moderados de LFA-1 y CD80, y niveles bajos de CD14. Los transfectantes de K562 que expresan DC-SIGN de tipo silvestre se generaron mediante la transfección de células K562 con 10 μ g de plásmido pRc/CMV-DC-SIGN mediante electroporación tal como se ha descrito anteriormente.

60 Los transfectantes de K562 estables que expresan ICAM-3 se obtuvieron mediante electroporación de pCDM8-ICAM-3 y pGK-HYG. Las células K562 se cultivaron en FCS al 10 % de RPMI, mientras que las células K562-ICAM-3 se cultivaron en RPMI y FCS al 10 %: FCS al 5 % de Iscove a 3:1 que contiene 0,5 mg/ml de higromicina para mantener la expresión de ICAM-3.

65 Los linfocitos NK sin tratamiento previo se aislaron de capas leucocíticas de donantes sanos. En resumen, la

fracción de PBMC obtenidas a través de centrifugación de Ficoll se agotó secuencialmente para células CD14⁺, y células CD3⁺, CD4⁺, y CD20⁺ usando separación de MACS. Las células CD14⁺ se agotaron mediante microperlas de CD14 (Miltenyi Biotec) en una columna LS (Miltenyi Biotec), y las células CD3⁺, CD4⁺, y CD20⁺ se marcaron con los mAb, T3B (αCD3), CLB-T4 (αCD4), MEM97 (αCD20), y a partir de ese momento se agotaron con microperlas de cabra-α-ratón (Miltenyi Biotec) en una columna LD (Miltenyi Biotec). Los linfocitos NK obtenidos de este modo se sometieron a ensayo de forma rutinaria para los marcadores CD16 de linfocitos NK (expresión de un 75 % a un 90 %), CD56 (expresión de un 80 % a un 95 %), los marcadores CD3, CD4, CD14 y CD20 que no son del linaje (todos con una expresión inferior a un 1 %), y el marcador CD69 de activación temprana (expresión de un 15 % en linfocitos NK no activados y expresión de un 75 % en linfocitos NK activados con IL-2 el día 1). Las poblaciones de linfocitos NK CD56^{dim} y CD56^{brillante} se aislaron de linfocitos NK obtenidos con MACS mediante separación de FACS en la expresión de CD56 baja y elevada, respectivamente. las poblaciones de linfocitos NK CD56^{dim} y CD56^{brillante} tenían una pureza superior a un 95 % tal como se evalúa mediante tinción con citometría de flujo para CD16 y CD56.

Activación de DC. Las DC inmaduras (2x10⁶ células/ml) se cultivaron durante 24 horas en presencia de IL-4 (500 U/ml, Schering-Plough, Bruselas, Bélgica), GM-CSF (800 U/ml; Schering-Plough, Bruselas, Bélgica) y cualquiera de LPS (10 ng/ml) o glicolípidos de LAM (15 µg/ml). El efecto de LAM en la activación inducida por LPS se determinó mediante la incubación previa de las DC inmaduras (300.000 células) con AZN-D2 (40 µg/ml) durante 30 minutos, y posteriormente con LPS en presencia de LAM (15 µg/ml) durante 18 horas. Los glicolípidos de LAM se obtuvieron en J. Belisle (Universidad del Estado de Colorado y en el NIH (contract NO1 AI-75320)) y contenían < 5 ng/mg de endotoxina. La activación se determinó mediante la expresión de la superficie celular de la clase II de MHC (HLA-DR) y las moléculas coestimuladoras CD80, CD83 y CD86 usando anticuerpos conjugados con PE.

Ensayo de adhesión de perlas fluorescentes. Las TransFluorSpheres modificadas con carboxilato (488/645 nm, 1,0 µm; Molecular Probes, Eugene, OR) se revistieron con gp120 del HIV-1 e ICAM-3 tal como se ha descrito¹⁴. La estreptavidina se acopló coherentemente a las perlas como se ha descrito y las perlas revestidas con estreptavidina se incubaron con glicoconjugados unidos a PAA biotinilados (50 pMol; Syntesome, Munich, Alemania). El ensayo de adhesión de perlas fluorescentes se realizó tal como se ha descrito¹⁴. Las perlas fluorescentes revestidas con ligando (20 perlas/célula) se añadieron a las células durante 45 minutos a 37 °C, se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo (FACScan, Becton Dickinson, Oxnard, CA), midiendo el porcentaje de células que tenían perlas fluorescentes unidas. Las perlas revestidas con LAM se generaron mediante revestimiento incubando perlas revestidas con estreptavidina con IgG de cabra anti-ratón del fragmento de F(ab')₂ biotinilado (6 µg/ml; Jackson ImmunoResearch) seguido de una incubación durante una noche con anticuerpo de ratón-anti-LAM (F30.5) a 4 °C. Las perlas se lavaron y se incubaron con 250 ng/ml de glicolípidos LAM purificados (obtenido en J. Belisle, Universidad del Estado de Colorado y el NIH (contract NO1 AI-75320)) durante una noche a 4 °C. Las perlas revestidas con SEA se generaron mediante la incubación de las perlas revestidas con estreptavidina con IgG de cabra anti-ratón del fragmento de F(ab')₂ biotinilado (6 µg/ml; Jackson ImmunoResearch), seguido de . La incubación durante una noche a 4 °C con anti-LDN MAb, o anti-LDN-DF MAb. Las perlas se lavaron y se incubaron con 1 µg/ml de SEA durante una noche a 4 °C. Básicamente, se incubaron previamente 50x10³ células en tampón de adhesión (Tris-HCl 20 mM a pH 8,0, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 2 mM, BSA al 0,5 %) con o MAb de bloqueo (20 µg/ml) o manano (50 µg/ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las perlas fluorescentes revestidas con ligando (20 perlas/célula) se añadieron a las células y la suspensión se incubó durante 45 minutos a 37 °C. Las células se lavaron y la adhesión se determinó usando citometría de flujo (FACScan, Becton Dickinson, Oxnard, CA), midiendo el porcentaje de células que tenían perlas fluorescentes unidas. Las perlas fluorescentes de gp120 del HIV-1 se prepararon como se ha descrito anteriormente¹⁹.

Adhesión de DC-SIGN-Fc. Las células se incubaron con DC-SIGN-Fc durante 30 minutos a 37 °C en condiciones de saturación (concentración: 10 µg/ml), y posteriormente con anticuerpos secundarios de cabra-α-humano conjugados con FITC para controlar la adhesión de DC-SIGN-Fc. Antes de la incubación con células, la DC-SIGN-Fc se incubó previamente durante 10 min a TA ya sea por medio, aDC-SIGN (AZN-D1, 50 µg/ml), manano (50 µg/ml), o EGTA (10 mM) para determinar la especificidad de la adhesión de DC-SIGN-Fc. La adhesión de DC-SIGN-Fc se determinó mediante citometría de flujo (FACS Calibur, Beckman Coulter).

Micobacterias. Las cepas H37Ra tanto de BCG de *M. bovis* (Pasteur) como de *M. tuberculosis* fueron detalles de A. Kolk (Royal Tropical Institute, Amsterdam). El BCG de *M. bovis* se cultivó *in vitro* usando caldo de cultivo de Middelbrook 7H9 complementado con Tween 80 al 0,05 % y albúmina-dextrosa-catalasa. Los glicolípidos ManLAM y AraLAM se obtuvieron en J. Belisle, Universidad del Estado de Colorado y el NIH (contract NO1 AI-75320). Las DC se infectaron con micobacterias mediante su co cultivo a una multiplicidad de infección apropiada (MOI) como se indica en las leyendas de la figura.

Ensayo de unión a micobacterias fluorescentes. La captura y la internalización de micobacterias con células se evaluó usando BCG de *M. bovis* conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Las bacterias (10⁹/ml) se marcaron mediante incubación de 0,5 mg de FITC por ml en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) a temperatura ambiente durante 1 hora. Las bacterias pulsadas con FITC se lavaron tres veces para retirar el FITC sin unir. La captura se determina midiendo el porcentaje de células que se unían a bacterias conjugadas con FITC usando citometría de flujo (FACS Calibur, Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA). La fagocitosis se

determinó usando una técnica de inactivación con fluorescencia como se ha informado anteriormente²⁹. En resumen, la inactivación de BCG de *M. bovis* conjugado con FITC unido a membrana no internalizada se consiguió mediante tratamiento de las células con azul de tripano al 0,05 % durante 5 minutos. La unión de *H. pylori* se evaluó mediante el marcado de las bacterias con FITC y la unión a las DC se investigó del mismo modo que el ensayo de perlas.

5 *Producción de citoquinas.* Para la detección de citoquinas, se cosecharon sobrenadantes de cultivo el día 1 y se congelaron a -80 °C hasta el análisis. Los sobrenadantes se analizaron para la presencia de IL-10 e IL-12p40 con ELISA (Biosource International, CA).

10 *Desfucosilación de SEA.* Los SEA se desfucosilaron mediante incubación de los antígenos a 100 °C durante 1 hora en TFA 0,1 M. Después de neutralización, el antígeno desfucosilado se revistió en placas de ELISA. La desfucosilación enzimática se realizó incubando el SEA en fosfato sódico 50 mM a pH = 5,0 con α 1,3/4-fucosidasa (0,4 mU/ μ g de SEA) (Calbiochem) durante una noche a 37 °C. El grado de desfucosilación de los antígenos se evaluó mediante su capacidad para unir los MAb que reconocen específicamente en los epítomos LDN-DF y Le^x de glicano fucosilados, mientras que la integridad de los otros epítomos de glicano, no fucosilados, se evaluó midiendo la reactividad con anti-LDN MAb.

20 *SDS-PAGE, Transferencia de Western y tinción con plata.* Los SEA se separaron con SDS-PAGE en condiciones reductoras en un gel de poliacrilamida al 12,5 %, usando el sistema Mini-Protean II (BioRad), y las proteínas se visualizaron mediante tinción con plata. Para la transferencia de Western, se transfirieron proteínas en una membrana de nitrocelulosa (Schleicher y Schuell). La membrana se bloqueó en una solución de BSA al 5 % en TSM durante 2 h seguido de incubación en 2 μ g/ml de DC-SIGN-Fc en tampón TSM que contiene BSA al 1 % durante 1 h. Después de lavado, la membrana se incubó posteriormente durante 1 h en IgG1 de cabra anti-humana conjugada con peroxidasa y se visualizaron bandas reactivas por detección con sustrato de CN/DAB (Pierce).

25 *Citotoxicidad.* El ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas convencional se usó para evaluar la citotoxicidad mediada por linfocitos NK. En resumen, se marcaron 1×10^6 células diana con 100 μ Ci de ⁵¹Cr durante 1 hora a 37 °C, se lavaron extensamente para retirar el ⁵¹Cr libre, se volvieron a suspender a 2500 células/pocillo (iDC y mDC) o 1000 células/pocillo (K562 y K562-DC-SIGN), y se incubaron con linfocitos NK durante 4 horas a 37 °C a las proporciones indicadas y en las condiciones indicadas. Después de 4 horas, se añadió líquido de centelleo (PerkinElmer) a los sobrenadantes, y la liberación de ⁵¹Cr se determinó en un contador micro-b (PerkinElmer).

30 *Maduración de DC mediada por linfocitos NK.* Los linfocitos NK en reposo y activados se obtuvieron mediante incubación durante una noche en medio y IL-2 (1000 U/ml), respectivamente. A partir de ese momento, los linfocitos NK en reposo y activados se incubaron durante una noche con DC inmaduras en una placa con fondo en U de 96 pocillos (Costar) en RPMI FCS al 10%. Los linfocitos NK se incubaron previamente durante 10 min. a TA con medio o mAb de α LFA-1 de bloqueo (NKI-L15, 50 μ g/ml), mientras que las DC se incubaron previamente con medio o mAb de α DC-SIGN de bloqueo (AZN-D2, 50 μ g/ml). Como un control positivo, las DC se incubaron durante una noche en presencia de LPS (2 μ g/ml). La maduración de las DC se evaluó mediante citometría de flujo (FACS Scan, Beckman Coulter) para los marcadores de maduración CD80, CD83, CD86, y HLA-DR con mAb conjugados con PE o conjugados con FITC.

35 *Activación de linfocitos NK inducida por DC.* Los linfocitos NK en reposo se incubaron durante 2 días con DC inmaduras o maduras (obtenidas por maduración en LPS) en una placa de fondo en U de 96 pocillos (Costar) en RPMI FCS al 10 %. La activación de linfocitos NK lucida por DC dependiente de LFA-1 se determinó con una incubación previa de linfocitos NK durante 10 min. con mAb de α LFA-1 (NKI-L15, 50 μ g/ml), mientras que la dependencia de DC-SIGN se evaluó con una incubación previa de DC durante 10 min. con mAb anti-DC-SIGN (AZN-D1 y AZN-D2, 50 μ g/ml). Como un control positivo, los linfocitos NK se incubaron durante 2 días con IL-2 (1000 U/ml). La activación de los linfocitos NK se evaluó mediante citometría de flujo (FACS Calibur, Beckman Coulter) para el marcador CD69 de activación temprana con los mAb conjugados con FITC.

40 *Inmunoprecipitación.* La superficie de los linfocitos NK se trató con yodo con 1 mCi de ¹²⁵I, o se biotiniló y posteriormente se lisó en tampón de lisis (Triton-X -100 al 1 %, TEA 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, PMSF 1 mM, 20 μ g/ml de inhibidor de tripsina, 20 μ g/ml de leupeptina, y 20 μ g/ml de aprotinina). Los ligandos de DC-SIGN, ICAM-2, ICAM-3, y LFA-1 se inmunoprecipitaron a partir de lisado de linfocitos NK aclarado previamente con prot A con perlas de prot A unidas covalente mente DC-SIGN-Fc, α ICAM-2 (12A2), α ICAM-3 (AZN-IC-3/1), y α LFA-1 (NKI-L15). Los inmunoprecipitados se redujeron en tampón de muestra (que contiene SDS al 4 % y b-mercaptoetanol al 5 %), se calentaron durante 5 min a 95 °C, y se desarrollaron en un gel de poliacrilamida con gradiente de un 5-15 % (SDS-PAGE). Como alternativa, algunos anticuerpos específicos frente a CD66acd o ICAM-3 o LFA-1 se revistieron en una placa de ELISA, posteriormente se añadieron lisados y se incubaron durante 1 h a 4 °C para replegar las proteínas específicas. La DC-SIGNFc se incubó para actividad de unión a las proteínas específicas y se hizo tinción con Fc PO de cabra anti humano y se desarrolló.

Equipo experimental

65 Las células dendríticas (DC) son fundamentales en la manipulación de patógenos para procesamiento y

presentación a linfocitos T, provocando de este modo una respuesta inmune apropiada. Las lectinas de tipo C se expresaron mediante la función de DC como receptores de reconocimiento de patógenos; sin embargo su especificidad para estructuras de carbohidrato en patógenos no se entiende totalmente. Los inventores aquí analizaron la especificidad de carbohidrato de DC-SIGN/CD209, el receptor del HIV-1 en DC documentado recientemente. Los estudios de los inventores muestran que DC-SIGN se une con afinidad elevada a glicoconjugados que contienen tanto manosa como fucosa sintéticas. Estas estructuras de carbohidrato se expresan abundantemente por patógenos como se demuestra mediante la afinidad de DC-SIGN hacia glicanos de superficie naturales de los patógenos humanos *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Leishmania mexicana* y *Schistosoma mansoni*. De forma sorprendente, estos patógenos dirigen a DC-SIGN para que infecte las DC y además también para modular las respuestas inmunes mediadas por DC.

Este análisis amplía el conocimiento de los inventores sobre la especificidad de DC-SIGN con respecto a carbohidratos y patógenos, e identifica que esta lectina es fundamental en interacciones de patógeno-DC.

15 Ejemplo 1: Nueva especificidad de Carbohidrato para DC-SIGN

Para estudios *in vitro*, los inventores generaron una proteína quimérica de DC-SIGN con una etiqueta de Fc de IgG1, que los inventores usaron para identificar sistemáticamente en un formato de ELISA para reactividad con un panel de glicoconjugados sintéticos que contienen restos de manosa o fucosa y sus derivados en forma multimérica.

Como se ha informado anteriormente, la DC-SIGN-Fc se une no solamente a manano derivado de levadura purificado y el gp120del HIV-1 que contiene alta manosa, sino también a glicoconjugados que contienen manosa menos complejos, es decir, manosa y $\alpha 1 \rightarrow 3$, $\alpha 1 \rightarrow 6$ manotriosa (Tabla I, Figura 1). De forma sorprendente, la DC-SIGN se une a antígenos del grupo sanguíneo de Lewis (Le^x , Le^y , Le^a , Le^b), glicano que comprende al menos una fucosa terminal unida en la posición $\alpha 1,3$ o $\alpha 1,4$ a N-acetilglucosamina (Le^x , Le^y , Le^a , Le^b , LDNF), o en la posición $\alpha 1,2$ a Galactosa (Le^y , Le^b) (Tabla I, Figura 1). La sialilación de Le^x (que proporciona sialil- Le^x , un ligando de L-, E- y P-selectina) elimina completamente el reconocimiento por DC-SIGN, lo que indica que DC-SIGN tienen una especificidad de carbohidrato que es distinta de la de las selectinas que median los leucocitos rodantes. La sulfatación redujo la afinidad de unión de DC-SIGN hacia Le^x , así como hacia Le^a (Figura 1c). Para comparar con más detalle la afinidad de la unión de DC-SIGN a Le^x y a $\alpha 1 \rightarrow 3$, $\alpha 1 \rightarrow 6$ -manotriosa, se realizaron estudios de valoración con los diferentes glicoconjugados de unión a DC-SIGN (Figura 1c). De forma sorprendente, la DC-SIGN se une con afinidad mucho más elevada al carbohidrato Le^x que contiene fucosa que al que contiene manotriosa. La actividad de unión de DC-SIGN-Fc a estas estructuras de glicano era específica, ya que algunos anticuerpos anti-DC-SIGN bloqueaban la interacción (Figura 1c).

Para determinar si DC-SIGN-Fc presenta un perfil de reconocimiento de carbohidrato similar como DC-SIGN expresada en la superficie celular, se estudiaron tanto transfectantes de DC-SIGN como DC derivadas de monocitos para actividad de unión a carbohidrato usando un ensayo de unión a perlas fluorescentes con diferentes glicoconjugados ($\alpha 1 \rightarrow 3$, $\alpha 1 \rightarrow 6$ manotriosa, Le^x y sulfo- Le^a) (Figura 2). De hecho, DC-SIGN expresada por los transfectantes de K562 se unía de forma similar a los glicoconjugados tal como DC-SIGN-Fc y la unión se inhibía completamente por los anticuerpos anti-DC-SIGN (Figura 2). Incluso aunque DC expresan otras muchas lectinas de tipo C en su superficie celular, los datos de los inventores demuestra que los glicoconjugados que contienen Le^x y $\alpha 1 \rightarrow 3$, $\alpha 1 \rightarrow 6$ manotriosa se unen preferentemente con DC-SIGN. La interacción es específica ya que los anticuerpos anti-DC-SIGN casi inhibían completamente la actividad de unión. Esto ilustra que DC-SIGN es el receptor principal en las DC para estas estructuras de carbohidrato. La unión de sulfo- Le^a a DC solamente se podría haber bloqueado parcialmente con anticuerpos anti-DC-SIGN lo que indica que otras lectinas de tipo C en DC compiten con DC-SIGN por la unión de sulfo- Le^a . los datos de los inventores muestran que la DC-SIGN reconoce una gama mayor de estructuras de glicano, que incluye antígenos del grupo sanguíneo de Lewis, de lo que se había observado hasta ahora. Por lo tanto, DC-SIGN puede ser un receptor importante para el reconocimiento de nuevas dianas biológicamente relevantes expresadas por el hospedador, o como alternativa, por patógenos humanos.

55 Ejemplo 2. La nueva especificidad de carbohidrato (Le^x y alta manosa) identifican nuevos patógenos (*Helicobacter pylori*, *Schistosoma mansoni*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania mexicana*) que interactúan con DC-SIGN

Posteriormente, los inventores investigaron la unión de DC-SIGN a patógenos humanos que expresan glicanos que contienen manosa o fucosa. Tanto la bacteria *Helicobacter pylori* gram-negativa, que induce úlceras pépticas y carcinoma gástrico²⁰, como el parásito gusano (el agente causal de la esquistosomiasis) expresan Le^x ²¹. En *H. pylori*, Le^x está presente en lipopolisacárido localizado en la superficie, mientras que, en *S. mansoni*, Le^x se expresa en todas las etapas del parásito, incluyendo antígeno de huevo soluble (SEA)²¹. La unión de DC-SIGN-Fc a lisado de *H. pylori* positivo para Le^x y para extraer de *S. mansoni* era fuerte y se inhibía completamente con anticuerpos anti-DC-SIGN (Figura 3); Cuando se analizan dos formas diferentes de LPS de Klebsiella, una contiene protección de manosa y la otra no la contiene (Len1 y Len111 respectivamente) (Figura 3B). DC-SIGN expresada por DC también se unía al LPS purificado de *H. pylori* (Figura 4). La unión de DC a tanto a células de *H. pylori* como a LPS purificado se podría bloquear completamente con Mab anti-DC-SIGN (Figura 4). También los glicanos presentes en *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis, se unen con DC-SIGN (Figura 3). El glicano de

superficie protegida con manosa, lipoarabinomanano de *Mycobacterium tuberculosis*, contiene probablemente el sitio de reconocimiento para DC-SIGN. Esto se apoya adicionalmente por el hecho de que DC-SIGN también se unía al lipofosfoglicano con superficie protegida con manosa (LPG) expresado por un parásito unicelular que causa leishmaniasis (Figura 3). La unión de DC-SIGN a *Leishmania* se informó muy recientemente³⁰ pero los inventores demuestran aquí que LPG es la estructura en *Leishmania* que se reconoce con DC-SIGN (Figura 3). No se observó unión de DC-SIGN a tres patógenos humanos bacterianos Gram-negativos clínicamente relevantes (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*) ni a *Staphylococcus aureus* Gram-positivo. Sin embargo, otros aislados clínicos de *Klebsiella* que contienen un LPS protegido con manosa se unen a DC-SIGN. Estos hallazgos indican que la unión de DC-SIGN a patógenos es selectiva, y que la especificidad de carbohidrato de DC-SIGN gobierna un reconocimiento del patógeno más amplio que solamente algunos virus tales como el virus del HIV-1 y del Ébola^{12,22}.

Ejemplo 3 DC-SIGN interactúa con *M. tuberculosis* a través de glicolípidos de ManLAM

Se revistieron micobacterias completas tales como la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* y el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) de *M. bovis* y se analizó la interacción de DC-SIGN con estos patógenos usando el ensayo de unión a DC-SIGN-Fc. El BCG de *M. bovis* es una cepa de tuberculosis que casi no es patógena aunque mantiene las propiedades inmunológicas de la tuberculosis. DC-SIGN-Fc interactuó de forma específica tanto con de H37Ra *M. tuberculosis* como con BCG de *M. bovis*, ya que la interacción se inhibió con anticuerpos específicos para DC-SIGN de bloqueo (Figura 6a). *M. smegmatis*, una cepa avirulenta que no contiene una protección Manosa, no se unía a DC-SIGN (los datos no se muestran). Además, una quimera de Fc irrelevante, ICAM-3-Fc, no interactuaba con las micobacterias (Figura 6a). La interacción está mediada por el dominio de lectina de tipo C de DC-SIGN, ya que la unión tanto a *M. tuberculosis* como a BCG de *M. bovis* la inhibía EGTA, manano y el anticuerpo específico de DC-SIGN, AZN-D1, que reconoce el dominio de lectina²³ (Figura 6a).

A continuación, los inventores investigaron la unión de DC-SIGN a lipoarabinomanano micobacteriano purificado (LAM), ya que DC-SIGN tiene una afinidad elevada hacia carbohidratos que contienen manosa y LAM es el componente principal que contiene manosa de la pared celular micobacteriana³¹. LAM comprende un núcleo de polisacárido rico en manosa, que contiene cadenas laterales de altamente ramificadas de arabinofuranosilo, y un ancla de GPI (Figura 6b). El LAM aislado de *M. tuberculosis* contiene restos de manosa que consisten exclusivamente en mono-, di- y trímeros de α -D-manosas unidos directamente a los extremos de arabinofuranosilo y se denomina ManLAM, mientras que el LAM aislado del *M. smegmatis* de crecimiento rápido no está protegido con manosa y se denomina AraLAM³¹ (Figura 6b). De forma sorprendente, el ManLAM purificado se unía de forma eficaz mediante DC-SIGN, al contrario que AraLAM (Figura 6c), lo que demuestra que la DC-SIGN interactúan de forma específica con los mono-, di- y trímeros de α -D-manosas de ManLAM. Incluso a concentraciones elevadas, la DC-SIGN no se unía a AraLAM, lo que demuestra una especificidad privada hacia ManLAM y su protección de manosa (Figura 6d). La interacción de DC-SIGN a ManLAM es específica, ya que la unión se inhibía mediante anticuerpos frente a DC-SIGN, mientras que una quimera de Fc irrelevante no interactuaba con ManLAM (Figura 6c). DC-SIGN interactúa del mismo modo tanto con ManLAM como con el BCG de *M. bovis* completo lo que indica que DC-SIGN se une a micobacterias a través de ManLAM (Figura 6a y c).

Ejemplo 4 Tanto micobacterias como ManLAM interactúan con el sitio de unión primario de DC-SIGN

Los inventores usaron los transfectantes de K562 que expresan DC-SIGN de forma estable para investigar la unión de DC-SIGN expresado en la superficie celular tanto a BCG de *M. bovis*, el componente micobacteriano, ManLAM. Estas células no expresan los receptores micobacterianos informados anteriormente, Receptor de Manosa (MR), CD11b y CD11c (Figura 7a). Los transfectantes de K562 expresan niveles elevados de DC-SIGN (Figura 7a) y se unen fuertemente tanto a BCG de *M. bovis* como a ManLAM, al contrario que las células K562 transfectadas simuladas (Figura 7b). La interacción se bloquea con anticuerpos específicos de DC-SIGN (Figura 7b). La interacción de DC-SIGN tanto con BCG de *M. bovis* como con ManLAM es similar a la de los otros ligandos de DC-SIGN, ICAM-3 y HIV-1 (Figura 7b). Por lo tanto, la DC-SIGN celular se une específicamente tanto a BCG de *M. bovis* como a ManLAM, tal como se observó con DC-SIGN-Fc recombinante (Figura 6c).

El dominio de lectina de tipo C de DC-SIGN contiene dos iones calcio, y los restos de aminoácidos que están en contacto directo con Ca^{2+} en el sitio 2 (Glu³⁴⁷, Asn³⁴⁹, Glu³⁵⁴ y Asn³⁶⁵) forman el núcleo del sitio de unión al ligando²³. El cambio en DC-SIGN ya sea en Glu³⁴⁷ en Gln (E347Q), o Asn³⁴⁹ y Asn³⁶⁵ en Asp, dio como resultado una pérdida completa de la unión a micobacterias completas y ManLAM (Figura 7b y los datos no se muestran), tal del mismo modo al que se mostró anteriormente tanto para ICAM-3 como para gp120 del HIV-1 (Figura 7b). El Ca^{2+} en el sitio 1, el denominado sitio auxiliar, coordina la colocación correcta del sitio de unión primario, y la pérdida de este Ca^{2+} mediante la mutación de Asp³²⁰, Glu³²⁴ (E324A), Asn³⁵⁰ o Asp³⁵⁵ en restos de Ala dio como resultado una pérdida completa tanto de la unión a BCG de *M. bovis* como a ManLAM (Figura 7b y los resultados no se muestran).

Recientemente, los inventores demostraron que el sitio de unión de DC-SIGN para su ligando celular, ICAM-3, es distinto del de gp120 del HIV-1, ya que una mutación específica en DC-SIGN (V351G) anulaba la unión a ICAM-3, pero no a gp120 del HIV-1 (Figura 7c). De forma sorprendente, el mutante V351G de DC-SIGN también interactúa con BCG de *M. bovis* así como con ManLAM (Figura 7c), lo que demuestra que tanto el HIV-1 como algunas

micobacterias se unen del mismo modo a DC-SIGN en un sitio distinto al del ligando celular, ICAM-3. La unión similar tanto de BCG de *M. bovis* como de ManLAM a mutantes de DC-SIGN apoya adicionalmente de los hallazgos de los inventores de que DC-SIGN interactúa de forma específica con ManLAM en micobacterias completas. La unión de perlas fluorescentes revestidas con distintas neoglicoproteínas de ManLAM que consisten en Arabinosa, Arabinosa- α 1,5 manosa, Arabinosa- α -1,5Man- α -1,2 Man, Ara- α -1,5Man- α -1,2Man- α -1,2Man o Ara6 demuestran que DC-SIGN se reconoce en particular en ManLAM, una di-manosa (componente de Man α 1,2) o una manosa triosa (componente de Man α 1,2) (Figura 7D).

Ejemplo 5 DC-SIGN es un receptor principal para micobacterias en DC

Las DC inmaduras expresan, además de niveles elevados de DC-SIGN, niveles elevados de los receptores de MR, CD11b y CD11c (Figura 8a), que se informó anteriormente para mediar la unión de micobacterias mediante macrófagos. Los inventores usaron anticuerpos de bloqueo frente a estos receptores para evaluar sus contribuciones a la unión a ManLAM con DC. Las DC inmaduras se unen fuertemente a ManLAM, pero no la AraLAM, y la interacción se inhibió con el anticuerpo específico para DC-SIGN, pero de forma sorprendente no con cualquiera de los anticuerpos frente a MR, CD11b o CD11c (Figura 8b). Tanto EGTA como el inhibidor específico de lectina de tipo C, manano, bloquean la unión a ManLAM con DC hasta un punto similar al de los anticuerpos específicos para DC-SIGN, lo que demuestra que DC-SIGN es la lectina de tipo C de unión a ManLAM primaria en DC inmaduras que se une a ManLAM (Figura 8b).

La contribución principal de DC-SIGN a la interacción de las DC inmaduras con ManLAM motivó a los inventores para que investigaran si DC-SIGN podría ser importante en la interacción de las DC inmaduras con respecto a micobacterias completas. Las DC inmaduras interactúan fuertemente con BCG de *M. bovis* (Figura 8c). De forma sorprendente, DC-SIGN es un receptor principal para BCG de *M. bovis*, ya que los anticuerpos frente a DC-SIGN inhibían fuertemente la infección de las DC inmaduras con BCG de *M. bovis* (Figura 8c). Los anticuerpos frente al MR, CD11b y CD11c no inhibían la infección, mientras que el inhibidor de lectina de tipo C, manano, bloqueaba la infección hasta un nivel similar al de los anticuerpos DC-SIGN (Figura 8c). Además, la manosa -BSA de ligando de MR no inhibía la interacción de DC con BCG de *M. bovis* (Figura 8c) lo que demuestra que los dominios de lectina de tipo C de MR no están implicados en la infección con BCG de *M. bovis* de DC. Tanto el anticuerpo anti-MR como la manosa -BSA son inhibidores de la función de MR ya que bloquean la unión de otro dextrano ligando de MR a DC (los resultados no se muestran). Estos resultados demuestran que DC-SIGN es la lectina de tipo C primaria en DC que funciona como un receptor para BCG de *M. bovis*. Otros receptores que no son lectina pueden participar en la interacción ya que la infección no estaba inhibida completamente con anticuerpos frente a DC-SIGN (Figura 8c).

Ejemplo 6 DC-SIGN facilita la captura y la internalización de BCG de *M. bovis* por DC inmaduras a través de la unión del componente de la pared celular micobacteriana, ManLAM.

A continuación, los inventores investigaron si DC-SIGN media la internalización de BCG de *M. bovis* usando azul de tripano para inactivar las micobacterias de superficie conjugadas con FITC. Las células K562 transfectadas simuladas no fagocitarían a BCG de *M. bovis*, mientras que un 50 % del transfectante de K562, que expresa DC-SIGN, había internalizado a BCG de *M. bovis* a los 45 minutos (Figura 8d). Tanto el manano como los anticuerpos frente a DC-SIGN bloqueaban la internalización de BCG de *M. bovis* (Figura 8d).

Las DC inmaduras son células altamente fagocitantes y ciertamente a los 45 minutos, más de un 90 % de las células dendríticas que se unían a BCG de *M. bovis*, había internalizado las micobacterias (Figura 8e). del mismo modo en que se observaba para la unión de BCG de *M. bovis* con DC (Figura 8c), la fagocitosis de BCG de *M. bovis* se bloquea parcialmente con anticuerpos frente a DC-SIGN mientras que tanto los anticuerpos anti-MR como la manosa-BSA, ligando de MR no inhibían la fagocitosis observada (Figura 8e). Estos resultados demuestran que DC-SIGN facilita la captura de la internalización de BCG de *M. bovis* por DC inmaduras a través de la unión del componente de la pared celular micobacteriana, ManLAM.

Ejemplo 7. Micobacterias y ManLAM se internalizan con DC-SIGN y se dirigen a lisosomas

Recientemente, los inventores han demostrado que DC-SIGN puede funcionar como un receptor de antígeno que internaliza antígenos y los dirige a compartimentos lisosómicos a la presentación en la Clase II¹⁰ de MHC. Por lo tanto, el destino del BCG de *M. bovis* capturado por DC inmaduras fue seguido de análisis de inmunofluorescencia. Las DC inmaduras se incubaron con BCG de *M. bovis* conjugado con FITC durante 2 horas y tanto DC-SIGN como Lamp-1 se tiñeron (Figura 9a). La colocalización observada de DC-SIGN con BCG de *M. bovis* conjugado con FITC apoya adicionalmente un papel para DC-SIGN en la captura e internalización de micobacterias (Figura 9a). Las micobacterias fagocitadas se dirigen a los lisosomas ya que las micobacterias internalizadas conjugadas con FITC se colocalizan con tinción de Lamp-1 (Figura 9a). De forma análoga, ManLAM también se capturó y se internalizó con DC-SIGN en DC inmaduras ya que la tinción de ManLAM se colocalizaba con DC-SIGN (Figura 9a) mientras que AraLAM no se internalizaba con DC (los resultados no hemos). El ManLAM internalizado colocalizado con el marcador lisosómico LAMP-1/CD107a en DC inmaduras (Figura 9a) indicaba que el ManLAM internalizado se dirige a lisosomas. Por lo tanto, tanto las micobacterias completas como el componente de la pared celular, ManLAM, se

internalizan de modo similar por las DC inmaduras a través de DC-SIGN, lo que apoya los resultados de que DC-SIGN interactúa con ManLAM en micobacterias.

Recientemente, los inventores han demostrado que la unión de ligandos solubles o anticuerpos a DC-SIGN desencadena la internalización del complejo de DC-SIGN-ligando a los endosomas/lisosomas tardíos, y da como resultado la regulación negativa de DC-SIGN de la superficie¹⁰. Por lo tanto, los inventores investigaron si DC-SIGN se internaliza después de la unión a ManLAM midiendo la expresión de DC-SIGN de la superficie celular después de la unión a ManLAM usando un anticuerpo específico frente a DC-SIGN. De hecho, la unión de ManLAM, pero no de AraLAM, a DC-SIGN da como resultado la regulación negativa de DC-SIGN (Figura 9b), lo que demuestra que DC-SIGN en DC se unía ManLAM y media la internalización de ManLAM a lisosomas CD107a⁺. Además, otros receptores de micobacterias tales como MR, CD11b y CD11c no estaban regulados de forma negativa (Figura 9b). Por lo tanto, la unión de ManLAM a DC-SIGN desencadena la internalización del complejo de DC-SIGN/ManLAM, y podría permitir el procesamiento del antígeno de ManLAM con las DC.

15 **Ejemplo 8. ManLAM cambia la producción de citoquinas con DC a través de DC-SIGN**

ManLAM está presente no solamente como un componente de la pared celular micobacteriana sino que también se secreta de fagosomas después de ingestión de macrófagos de *M. tuberculosis*³¹. Potencialmente, algunas micobacterias dentro de macrófagos infectados pueden influir en células inmunes transeúntes y modular la respuesta inmune a través de la secreción de ManLAM. La citoquina IL-10 es un factor inmunosupresor potente inducido en macrófagos por algunas bacterias intracelulares para reducir las respuestas inmunes del hospedador y estimular su supervivencia³². los inventores investigaron la influencia de la unión de ManLAM a DC-SIGN en la producción de IL-10 con DC. ManLAM solo no inducía la producción de IL-10 con DC inmaduras (Figura 10a). De forma sorprendente, ManLAM, pero no AraLAM, inducía fuertemente la producción de IL-10 con DC, cuando recibían de forma simultánea una señal de activación, tal como LPS (Figura 10a). Esta inducción de IL-10 se inhibía completamente con anticuerpos específicos para DC-SIGN a nivel de las DC activadas con LPS solamente (Figura 10a). Los hallazgos de que solamente ManLAM podría inducir la producción de IL-10, que se podría bloquear con anticuerpos específicos para DC-SIGN indica que la inducción de IL-10 es específica para la interacción de ManLAM/DC-SIGN. Algunos anticuerpos frente a DC-SIGN solamente no inducían la producción de IL-10 con DC activadas con LPS (Figura 10a), lo que demuestra que el ligamiento de DC-SIGN solo no es suficiente para la inducción de IL-10. Por lo tanto, la unión de ManLAM a DC-SIGN desencadena señales intracelulares que inducen la producción de IL-10 con DC, lo que indica que las micobacterias se dirigen a DC-SIGN para suprimir la respuesta inmune y estimula su supervivencia en el hospedador. Las DC tanto inmaduras como activadas con LPS, solas o junto con ManLAM, producían cantidades muy bajas de IL-12p70 (<5 pg/ml). La infección de DC inmaduras con BCG de *M. bovis* inducía una fuerte producción de IL-10 que no se inhibía con anticuerpos frente a DC-SIGN (Figura 10b). No se observaron diferencias en presencia de ManLAM (Figura 10b). Estos resultados sugieren que algunas micobacterias inducen la producción de IL-10 por infección directa así como por secreción de ManLAM.

40 **Ejemplo 9. ManLAM inhibe la activación de mediada DC por TLR4 a través de DC-SIGN**

Las DC inmaduras son altamente eficaces en la captura y procesamiento de antígenos, mientras que las DC maduras están especializadas en la activación de linfocitos T sin tratamiento previo necesaria para las respuestas inmunes celulares. Las DC inmaduras maduran como respuesta señales de 'peligro' específicas tales como componentes bacterianos (LPS) o citoquinas inflamatorias (TNF α , PGE2). Los inventores investigaron el efecto de ManLAM en la maduración de DC. Ni ManLAM ni AraLAM indujeron la maduración de DC, ya que tanto ManLAM como AraLAM, al contrario que LPS que estimula la TLR4, no regulaban de forma positiva la expresión de los marcadores de activación CD80, CD83, CD86 o HLA-DR (Figura 11a).

Las infecciones micobacterianas agudas representan sitios de inflamación que atraen e inducen la maduración de DC a través de la presencia de componentes de maduración. Por lo tanto, los inventores investigaron el efecto de ManLAM y AraLAM junto con el LPS bacteriano estimulador. La interacción del receptor 4 de tipo Toll (TLR4) con LPS genera señalización intracelular, más en particular a través del factor de transcripción NF κ B, que da como resultado la activación/maduración de DC. De hecho, las DC maduran de forma eficaz en presencia de LPS solo (Figura 11b). De forma sorprendente, esta activación inducida por LPS se inhibe en presencia de ManLAM, dado que los niveles de expresión de los marcadores de activación, CD80, CD83 y CD86, eran considerablemente menores que los de las DC activadas con LPS (Figura 11b). La inhibición observada de la activación/maduración de DC es específica para ManLAM, dado que AraLAM no inhibía la activación de DC (Figura 11b). Esto se apoya adicionalmente mediante la capacidad de algunos anticuerpos frente a DC-SIGN, que inhiben la unión a ManLAM, para restablecer completamente la maduración inducida por LPS en presencia de ManLAM (Figura 11b). Estos resultados indican que la unión de ManLAM a DC-SIGN genera señales intracelulares que interfieren con la activación de DC mediada por TLR4. Además tomas de procesos específico para la interacción de ManLAM-DC-SIGN y el ligamiento de DC-SIGN solo no es suficiente dado que algunos anticuerpos frente a DC-SIGN no bloquean la activación/maduración de las DC inducida por LPS (Figura 11b).

65 **Ejemplo 10. La maduración de las DC lucida por BCG de *M. bovis* se inhibe con ManLAM.**

Tanto *M. tuberculosis* como BCG de *M. bovis* son capaces de inducir maduración de DC a través de sus componentes de la pared celular a través de señalización mediada por TLR2 y TLR4³³⁻³⁶. De hecho, la infección de DC inmaduras con BCG de *M. bovis* da como resultado la maduración de DC, tal como se demuestra mediante el aumento de la expresión de la clase II de MHC y las moléculas coestimuladoras CD80, CD83 y CD86 después de infección con BCG de *M. bovis* (Figura 12a). Varios que la continuación, los inventores investigaron si la unión de ManLAM a DC-SIGN evitaba a la maduración de las DC inducida por BCG de *M. bovis*, dado que algunas DC inmaduras atraídas a sitios de infección micobacteriana se encontrarían tanto con ManLAM secretado como con micobacterias intactas. De forma sorprendente, la maduración de las DC inducida por BCG de *M. bovis* se inhibe fuertemente con ManLAM (Figura 12b). La expresión de la clase II de MHC, CD80, CD83 y CD86 en las DC infectadas con BCG de *M. bovis* en presencia de ManLAM era considerablemente menor que en las DC infectadas con BCG de *M. bovis* (Figura 12b). Además, la maduración se restablecía en gran medida cuando las DC se incuban previamente con el anticuerpo de bloqueo específico para DC-SIGN (Figura 12b), lo que demuestra que la interacción de ManLAM con DC-SIGN evita la maduración de las DC con BCG de *M. bovis*. Además, AraLAM no bloqueaba la maduración de las DC con BCG de *M. bovis* (Figura 11c), ya que las moléculas coestimuladoras, CD80, CD83 y CD86, se expresan a niveles similares tanto en las DC infectadas como en las DC infectadas, tratadas con AraLAM. Esto indica que la interacción de DC-SIGN-ManLAM bloquea la maduración de las DC inducida por LPS así como por BCG de *M. bovis*.

Ejemplo 11. Dos antígenos de huevo soluble de *S. mansoni* (SEA) se unen a células dendríticas (DC) inmaduras humanas a través de interacción con DC-SIGN.

Dado que las DC son fundamentales en la dirección de las respuestas de Th1-Th2, los inventores buscaron un receptor de la superficie celular expresado en DC que interactúa con SEA de *S. mansoni*. Para detectar la unión de SEA a DC inmaduras humanas, se desarrolló un ensayo de adhesión de perlas fluorescentes. Las perlas fluorescentes se revistieron previamente con anticuerpos monoclonales (MAb) para antígenos de glicano de SEA que a continuación se usaron para capturar SEA. Se permitió que las perlas conjugadas interactuaran con las DC. SEA es una mezcla de glicoproteínas, que contiene muchos antígenos glicano de inmunogénicos (3, 36). Los antígenos de glicano principales presentes en SEA, y el reconocimiento de estos antígenos por los MAb anti-glicano, se representan en la Figura 13. Para capturar SEA en las perlas fluorescentes, los inventores usaron los MAb frente a GalNAc β 1,4GlcNAc (LDN) y GalNAc β 1,4(Fuca1,2Fuca1,3)GlcNAc (LDN-DF) (Figura 13), ambos epítopos que se producen en muchos glicoconjugados dentro de SEA y que están ausentes en las DC. Una fuerte unión de SEA a las DC se observó con perlas fluorescentes revestidas con SEA que se acoplaban a través de MAb anti-LDN así como a través de MAb anti-LDN-DF (Figura 14b). La unión de SEA a las DC era comparable en resistencia a la unión de gp120 del HIV-1 a las DC. Dado que la DC-SIGN de las lectinas de tipo C y el MR, que se expresan por DC inmaduras (Figura 14a), son receptores potenciales para el reconocimiento de antígenos de glicano, los inventores investigaron si algunos anticuerpos dirigidos frente al CRD de lectina de tipo C de estas moléculas, o hapteno de manano podrían inhibir la unión de SEA a las DC. La unión de SEA a las DC se bloqueaba fuertemente tanto por el MAb anti-DC-SIGN, AZN-D1, que se une al CRD de DC-SIGN como por manano, pero no por el clon 19 del MAb anti-MR (Figura 14b). Estos datos indican que DC-SIGN no es solamente un receptor de patógeno en DC para el HIV-1, sino también para SEA de Esquistosoma.

Ejemplo 12. Una subfracción de SEA contiene ligandos de alta afinidad para DC-SIGN.

Para analizar adicionalmente las propiedades de unión de DC-SIGN a SEA de *S. mansoni*, los inventores investigaban la unión del DC-SIGN-Fc quimérico soluble a SEA. En un ensayo basado en ELISA, la DC-SIGN-Fc presentaba una unión eficaz a paredes revestidas con SEA (Figura 15a). La unión de DC-SIGN-Fc a SEA está mediada por el CRD de DC-SIGN, dado que la interacción estaba completamente inhibida por el anticuerpo AZN-D1 anti-DC-SIGN, o EGTA que elimina iones Ca²⁺ que son esenciales para la unión a carbohidratos. Es probable que unión de DC-SIGN-Fc a SEA tenga una afinidad elevada, dado que se observó unión a concentraciones de revestimiento de SEA muy bajas (Figura 16). Dado que SEA contiene muchas glicoproteínas diferentes, los inventores investigaron si un subconjunto de glicoproteínas dentro de SEA interactúa con DC-SIGN. Las glicoproteínas de SEA se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante transferencia de Western con DC-SIGN-Fc y anticuerpos anti-glicano reactivos con Le^x y LDN-DF, respectivamente. Entre las proteínas presentes en SEA, una proteína principal de aproximadamente 70-80 kD, y dos proteínas con peso molecular elevado secundarias mostraban interacción con DC-SIGN-Fc soluble (Figura 17). De forma notable, algunas glicoproteínas de peso molecular aparente similar a las que reaccionan con DC-SIGN-Fc se unían a los MAb específicos para glicanos de Le^x y LDN-DF.

Ejemplo 13. DC-SIGN se une a glicanos α 3-fucosilados.

Muchas glicoproteínas de SEA están muy fucosiladas (3, 36). Dado que se ha informado que DC-SIGN puede presentar inhibición tanto con respecto a manosa como a fucosa, y la transferencia de Western de SEA sugería que algunos glicanos de Le^x y/o LDN-DF están presentes en proteínas de SEA con PM aparente similar al de las proteínas de SEA que se unen a DC-SIGN, los inventores exploraron si la defucosilación de SEA influye en su reconocimiento por DC-SIGN-Fc. El tratamiento de SEA con la α 1,3/1,4-fucosidasa de *Xanthomonas* dio como resultado una disminución de la reactividad de un 50 % de MAb anti-Le^x para SEA, mientras que no se observó

pérdida de reactividad, tal como se esperaba, con Mab anti-LDN-DF. El epítipo de LDN-DF contiene fucosa unida en el extremo $\alpha 2$ -terminal. Los resultados indican de este modo que el tratamiento con glicosidasa retiraba de forma específica parte de los restos de $\alpha 3$ -fucosa presentes en SEA. La pérdida de restos de $\alpha 3/4$ -fucosa en SEA después de tratamiento con la $\alpha 1,3/\alpha 1,4$ -fucosidasa de *Xanthomonas* también dio como resultado una pérdida de unión de un 25 % de DC-SIGN-Fc (los resultados no se muestra). Estos datos sugieren que algunos restos de fucosa unidos en las posiciones $\alpha 1,3/\alpha 1,4$ pueden ser importantes para la unión del DC-SIGN-Fc soluble a SEA.

A continuación, los inventores investigaron si uno o más de los antígenos Le^x , LDNF o LDN-DF de SEA fucosilados (véase la Figura 13) pueden funcionar como ligando o ligandos para DC-SIGN en SEA. Los inventores analizaron el potencial de DC-SIGN-Fc para unirse a neoglicoproteínas que contienen estos antígenos de glicano en ELISA. Los resultados muestran que DC-SIGN-Fc interactúa fuertemente con la neoglicoproteína HSA- Le^x y, en menor medida, con BSA-LDNF, que portando ambas una fucosa $\alpha 3$ -terminal. Por el contrario, DC-SIGN-Fc no se une a BSA-LDN-DF en el que la $\alpha 3$ -fucosa está protegida con una $\alpha 2$ -fucosa (Figura 18). La unión es dependiente de fucosa, dado que no se observó unión a neoglicoproteínas que llevan Gal $\beta 1,4$ GlcNAc (LN) o GalNAc $\beta 1,4$ GlcNAc (LDN). La unión a Le^x y LDNF por DC-SIGN se media a través de su CRD, dado que la unión se inhibía con anti-DC-SIGN y EDTA. En conclusión, estos resultados indican que DC-SIGN reconoce fuertemente al trisacárido $\alpha 3$ -fucosilado, Le^x , y lo más probablemente interactúan con glicanos $\alpha 3$ -fucosilados en SEA tales como Le^x y/o LDNF.

Ejemplo 14. El resto de aminoácido, Val³⁵¹, dentro de DC-SIGN es fundamental para la unión de DC-SIGN tanto a SEA como a Le^x

El dominio de lectina de tipo C de DC-SIGN se une a dos iones Ca^{2+} y esos restos de aminoácidos en estrecho contacto con Ca^{2+} en el sitio 2 (Glu³⁴⁷, Asn³⁴⁹, Glu³⁵⁴ y Asn³⁶⁵) o con Ca^{2+} en el sitio 1 (Asp³²⁰, Glu³²⁴, Asn³⁵⁰ y Asp³⁵⁵) son esenciales para la unión a ligandos³⁷. Dado que los resultados mencionados anteriormente indicaban que el trisacárido $\alpha 3$ -fucosilado, Le^x , en SEA puede funcionar como un ligando para DC-SIGN, los inventores investigaron las propiedades de unión de estos antígenos a transfectantes de células K562 que expresan formas mutadas de DC-SIGN. La mutación de cualquiera de E³²⁴ para Ala, o E³⁴⁷ para Gln en DC-SIGN (Figura 19a) dio como resultado una pérdida de interacción completa tanto con SEA como con Le^x , lo que indica que la unión a estos antígenos en media a través del sitio de unión a ligandos primario y depende de Ca^{2+} (Figura 19b). Esto es similar a los resultados informados para la unión de DC-SIGN a gp120 del HIV-1³⁷.

Recientemente se ha demostrado que una mutación específica en el CRD de DC-SIGN (V³⁵¹G) permite la unión de gp120 del HIV-1, pero elimina la unión a ICAM-3, un ligando de linfocitos T que se ha mostrado anteriormente que interactúa con DC-SIGN. Los resultados de los inventores indican que el mutante V³⁵¹G de DC-SIGN no se une a ninguno de SEA o Le^x , mientras que la unión al HIV-1 aún se observaba, lo que indica que Val³⁵¹ es esencial para la unión tanto a SEA como a Le^x , pero no al HIV-1 (Figura 19b). Para determinar si el sitio de unión a SEA se superpone con los sitios de unión de ICAM-3 o del HIV-1 en DC-SIGN, los inventores exploraron si SEA inhibe la interacción de DC-SIGN con respecto a ICAM-3 y gp120 del HIV-1 en un ensayo de unión a DC. Los resultados demuestran que SEA puede inhibir la interacción entre DC y ICAM-3 de una forma tan eficaz como el Mab anti-DC-SIGN, mientras que la unión de DC-SIGN al HIVgp120 solamente se inhibía parcialmente con SEA (Figura 19c). Estos resultados demuestran que el sitio de unión a SEA en DC-SIGN puede parecerse al sitio de unión a ICAM-3 y puede superponerse parcialmente al sitio de unión para el gp120 del HIV-1.

Ejemplo 15. L-SIGN no interactúa con la unión a DC-SIGN de SEA o Lewis X

L-SIGN, un receptor de adhesión que se parece a DC-SIGN en el reconocimiento de ICAM-2, ICAM-3 y HIV-gp120, contiene un CRD que es casi idéntico al de DC-SIGN³⁸, y ambos receptores reconocen N-glicanos de tipo alta manosa. Los resultados anteriores de los inventores demostraban una nueva actividad de unión de DC-SIGN a fucosilados glicanos y mostraban que Val³⁵¹ en DC-SIGN es esencial para esta actividad de unión. En la posición correspondiente en el CRD de L-SIGN, una Ser está presente en el lugar de la Val (Figura 19a), elevando la pregunta de si L-SIGN puede reconocer a SEA y Le^x . La unión de L-SIGN a estos antígenos se investigó con un ensayo de adhesión en el que las perlas fluorescentes que contienen SEA y Le^x -PAA, respectivamente, se incubaron con células K562 transfectadas que expresan DC-SIGN y L-SIGN recombinantes (Figura 19e). Las células K562 que expresan L-SIGN (K-L-SIGN) no interactuaban con SEA ni con Le^x -PAA, pero presentaban una interacción con gp120 del HIV-1. Las células K562 que expresa DC-SIGN (K-DC-SIGN) se unían a SEA y Le^x , tal como se esperaba (Figura 19b). Estos datos muestran que los dos receptores DC-SIGN y L-SIGN altamente relacionados tienen distintas características de especificidad de unión a carbohidrato y de reconocimiento de patógenos.

Ejemplo 16. La nueva especificidad de carbohidrato predice y confirma nuevas contraestructuras celulares para DC-SIGN; DC-SIGN reconoce carbohidratos de Le^x en CD66a presentes en granulocitos para mediar interacciones de DC-granulocitos

Se sabe que DC-SIGN interactúa con ICAM-2 e ICAM-3, sin embargo, los ligandos de glicano en estas moléculas todavía no se han identificado. El antígeno del grupo sanguíneo de Le^x (CD15) se expresa en células epiteliales de mucosa gástrica, y mediante leucocitos polimorfonucleares (granulocitos) (Figura 20a); de hecho, las perlas revestidas con DC-SIGN-Fc se unen fuertemente a granulocitos (Figura 20b). Además, DC-SIGN-Fc también se une

fuertemente a granulocitos (Figura 21). La unión es específica para DC-SIGN ya que se puede inhibir con anticuerpos anti-DC-SIGN, manano y supresión de calcio por EGTA y además con un anticuerpo anti- Le^x que indica que la interacción celular es dependiente de Le^x (Figura 20 y 21). Además, un anticuerpo frente a Le^x reduce de forma específica la adhesión observada de DC-SIGN a CD66a, CD66e y CD11b lo que demuestra que los carbohidratos de Le^x ciertamente participan en la interacción (Figuras 20, 54, 59D). Otras estructuras de glicano tales como Le^y y Le^b también pueden estar implicadas ya que el bloque observado no es completo. Esto demuestra que los granulocitos expresan una glicoproteína de la superficie celular que expresa una estructura de glicano que es reconocida por DC-SIGN.

Además, los inventores predijeron que basándose en el patrón de reconocimiento de carbohidratos de DC-SIGN (Figura 1), DC-SIGN también puede mediar la unión de DC a células tumorales, dado que la expresión de Le^y aumenta en muchos carcinomas que incluyen cánceres de ovario, páncreas, próstata, mama, colon y de pulmón no microcíticos²⁴, mientras que sulfo- Le^a está presente en ciertos tumores que expresan mucinas. Por lo tanto, estos resultados indican que el reconocimiento de estructuras de carbohidrato distintas por DC-SIGN puede permitir que la adhesión celular mediada por DC a linfocitos T, células endoteliales, PMN así como a células tumorales.

Los estudios de inmunoprecipitación revelaron que DC-SIGN-Fc no se une a las contraestructuras celulares de DC-SIGN, ICAM-2 o ICAM-3, de granulocitos pero se une a una nueva glicoproteína con un peso de la proteína de 66 kD que está solamente presente en granulocitos (Figura 22a). El hecho de que DC-SIGN sé una carbohidratos de Le^x y el hecho de que algunos granulocitos Express en niveles elevados de CD66a, un receptor de la superficie celular que lleva Le^x con un peso molecular de 66kD (Figura 22b y c), impulsó a los inventores a examinar la unión de CD66a-Fc a transfectantes que se expresan DC-SIGN y DC inmaduras que expresan DC-SIGN. Se observó una fuerte unión de CD66a a DC-SIGN expresada en transfectantes tanto de DC como de DC-SIGN (Figura 23c), similar a la observada para la unión a ICAM-3 (Figura 23b). las perlas sin revestir lo interactuaban con estas células (Figura 23a). La interacción de CD66a con DC-SIGN parecía más fuerte que la interacción de ICAM-3-DC-SIGN que se ha descrito anteriormente. Estos datos indican que CD66a es una nueva con contraestructura celular de DC-SIGN and y puede desempeñar un papel importante en la mediación de interacciones celulares de DC-granulocitos que desempeñan un papel en respuestas inmunes innatas.

Ejemplo 17. DC-SIGN se une fuertemente un subconjunto de células de sangre periférica.

Para determinar si DC-SIGN interactúa preferentemente con linfocitos T sin tratamiento previo expresan niveles elevados de ICAM-3, tal como se postuló previamente, los inventores comenzaron a investigar la unión de DC-SIGN a la población de PBL total de células. De forma sorprendente, DC-SIGN-Fc interactuaba con una población de células CD3⁻ que era CD56⁺ y que pertenecía al subconjunto de los linfocitos NK (Figura 24). Además, la interacción era dependiente de la concentración (Figura 25) y se podía bloquear con anticuerpos frente a DC-SIGN (Figura 24 y 25). Los linfocitos NK CD56⁺ en la sangre se pueden dividir en dos poblaciones celulares: linfocitos NK CD56^{dim}CD16⁺ y CD56^{elevado}CD16⁻ (Figura 26). DC-SIGN-Fc se unía de forma específica a la población de linfocitos NK CD56^{dim}CD16⁺ y la interacción se podía inhibir con anticuerpos anti-DC-SIGN (Figura 26). ICAM-1-Fc no interactuaba con la población de linfocitos NK CD56^{dim}CD16⁺, lo que demuestra que la interacción de DC-SIGN-Fc es específica y no está mediada por la etiqueta de Fc. Ambas poblaciones de linfocitos NK eran capaces de interactuar de forma específica con ICAM-1-Fc después de la activación de su LFA-1 de integrina $\beta 2$ (Figura 26). Por lo tanto, éstos resultados indican que las DC interactúan con los linfocitos NK CD56^{dim}CD16⁺ a través de DC-SIGN. De forma sorprendente, ambas poblaciones de linfocitos NK tienen niveles similares de ICAM-2 y ICAM-3, lo que indica que DC-SIGN se puede unir a otros ligandos nuevos en que la población de linfocitos NK CD56^{dim}CD16⁺. De hecho, la inmunoprecipitación revela que DC-SIGN-Fc se une, además de la ICAM-2, también a una molécula con un peso molecular de 166 kDa (Figura 27). Este ligando podría ser CD166 o CD16, que está altamente glicosilado y solamente se expresa en linfocitos NK.

Ejemplo 18. DC-SIGN media la interacción de las células DC-NK y está implicada en la lisis de DC inmaduras mediante linfocitos NK.

Para investigar si la interacción de DC-SIGN con linfocitos NK es relevante en la respuesta inmune mediada con linfocitos NK, los inventores investigaron tanto la crisis de DC con linfocitos NK como la maduración de DC con linfocitos NK; recientemente se han identificado dos procesos que desempeñan un papel importante en la inmunidad innata en.

DC-SIGN no inhibía en la maduración de DC con linfocitos NK (Figura 28) pero estaba implicado fuertemente en la lisis de DC inmaduras mediada por NK (Figura 29), dado que algunos anticuerpos frente a DC-SIGN inhibían la lisis de DC mediada por NK. Estos datos indican que DC-SIGN regula la interacción de las DC inmaduras con linfocitos NK mediante la unión a una proteína de 166 kDa en linfocitos NK CD56^{dim}CD16⁺. Esta interacción de células DC-SIGN-NK también aumenta fuertemente la lisis de las líneas celulares mediada por NK transfectadas con DC-SIGN (Figura 30), mientras que algunos anticuerpos frente a DC-SIGN inhiben la lisis. Estos resultados indican que DC-SIGN puede ser importante en la interacción de DC con linfocitos NK y que la inhibición de esta interacción evita la lisis mediada por NK.

Ejemplo 19. DC-SIGN interactúa con los tipos 1 y 2 del virus del Herpes simplex

Los resultados anteriores demostraba que DC-SIGN interactúa de forma específica con el HIV-1³⁹ y recientemente se publicó que DC-SIGN se une al virus de Ébola⁴⁰. Por lo tanto, los inventores investigaron si DC-SIGN y su homólogo, L-SIGN, pueden interactuar con otros virus que contienen proteínas de envoltura glicosiladas. De forma sorprendente, DC-SIGN-Fc se une fuertemente al virus del Herpes simplex (VHS)-1 y -2, ya esta interacción se inhibe de forma específica con anticuerpos frente a DC-SIGN (Figura 31). Un análisis adicional demuestra que DC-SIGN interactúa con la glicoproteína gB del VHS (Figura 32) dado que DC-SIGN expresado por DC y algunos transfectantes se unen fuertemente a perlas revestidas con gB. Esta interacción se bloquea con anticuerpos anti-DC-SIGN (Figura 32). La DC-SIGN se expresa de forma específica con DC y L-SIGN mediante células endoteliales sinusoidales de hígado (LSEC) y algunas poblaciones de macrófagos. Estos datos indican que tanto DC-SIGN como L-SIGN podrían estar implicados en la interacción del VHS con DC y LSEC, respectivamente. De hecho, las DC se unen fuertemente a gB del VHS-1 y las interacciones están mediadas con DC-SIGN, dado que algunos anticuerpos frente a DC-SIGN bloquean esta interacción (Figura 32). Por lo tanto, la interacción de DC con VHS está mediada con DC-SIGN y esta lectina de tipo C podría ser importante en la infección de las DC con estos virus. Además, estos datos podrían sugerir que estos virus se dirigen a DC-SIGN en las DC no solamente para infectar a estas DC sino también para evadir la respuesta inmune mediante la modulación de la función de DC, tal como demostraron los inventores para micobacterias y HIV-1.

Ejemplo 20

Materiales y métodos en particular para este ejemplo y relevantes para los experimentos que se describen en las leyendas de las figuras 33 a 66.

Cepas bacterianas.

Anteriormente se han descrito aislados clínicos de *H. pylori* de diferentes orígenes geográficos (Países Bajos, Canadá, Polonia, Italia, y la República Popular de China)⁵, así como la cepa NCTC 11637 de *H. pylori* y las variantes de fase 1c, K4.1, K5.1, 3a, y 1b⁹. La cepa 4187E de *H. pylori* y la generación de mutantes de desactivación genética, *futA* (gen HP0379) y *futB* (gen HP0651), se han descrito¹⁰. El aislado clínico J223 de *H. pylori* se obtuvo en el Dr. H.P. Wirth⁶. Algunas variantes de J223 positivas y negativas para Le^{xy} se aislaron tal como se ha descrito anteriormente⁹. En resumen, algunas bacterias de la biopsia se inocularon en placas Dent (agar de Columbia, sangre de caballo al 5 % + suplemento de Dent), seguido de un solo pasaje en fase fluida (caldo de cultivo de Brucella + suero bovino fetal al 3 %) y distribución sobre medios sólidos, tras lo cual se produjo en la detección de las variantes de fase de LPS mediante transferencia de colonias⁹. La formación de serotipos mediante análisis de Polimorfismo de Longitud de Fragmento Amplificado (AFLP) se realizó tal como se describe en la referencia³⁹ con las siguientes modificaciones: En un volumen final de 20 ml, se hizo digestión de 20 ng de ADN cromosómico purificado con 1 U de EcoRI (Pharmacia, Uppsala, Suecia) y 1 U de MseI (New England Biolabs, Beverly, MA). A continuación, el volumen final se elevó a 30 ml mediante la adición de 50 pmol cada uno del adaptador EcoRI y del adaptador MseI, 1.2 U de T4 ADN ligasa (Pharmacia), ATP 1 mM, y tampón de ligasa. Se permitió que los adaptadores se ligaran a los fragmentos de restricción durante 16 h a 167 °C, tras lo cual la muestra se diluyó con agua destilada en un volumen final de 500 ml. Para notificación de ADN se usaron el cebador EcoO marcado con Rojo Texas fluorescente (50-AGACTGCGTACCAATTC-30 ; Isogen Bioscience, Maarssen, Países Bajos) y el cebador MseO sin marcar (50-GACGATGAGTCCTGAG-30) en un ciclador térmico 9700 (PerkinElmer) del sistema de PCR de GeneAmp con 35 ciclos: desnaturalización (30 s a 94 °C), hibridación (30 s a 65-56 °C), y extensión de la molécula de ADN (60 s a 72 °C). En los primeros 12 ciclos, la temperatura de hibridación se redujo a 0,7 °C por ciclo. Después de finalizar el programa del ciclo, cada muestra se analizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un secuenciador de ADN automatizado Vistra 725 (Amersham Life Science). Las imágenes de AFLP fluorescentes se almacenaron como archivos TIFF con el software de TIFF, Vistra 2 (Amersham).

Anticuerpos monoclonales y glicoconjugados.

Las cepas de *H. pylori* y variantes de fase se sometieron a formación de serotipo tal como se ha descrito anteriormente⁵ con los siguientes anticuerpos monoclonales (mAb): Hp151, específico para Le^y, 6H3, específico para Le^x monomérico y 4D2, específico para el tipo 1 de H (los tres, un detalle generoso de R. Negrini, General Hospital, Brescia, Italia). El Mab, 54.1F6A, específico para Lewis x polimérico (un detalle generoso de G. van Dam, Leiden, Países Bajos), NAM61-1A2, específico para el antígeno i (un detalle generoso de D. Blanchard, Regional Blood Transfusion Service, Nantes, Francia)¹⁰. Los Mab, AZN-D1 y AZN-D2²¹, se usaron para bloquear DC-SIGN y el Clon 17 de MAb (un detalle generoso de S. Gordon, Universidad de Oxford, UK) se usó para bloquear el receptor de manosa. Los glicoconjugados sintéticos (Syntesome, Munich, Alemania) están formados por mono- y oligosacáridos que se unían de forma muy equivalente a un vehículo de poliacrilamida. Los antígenos de Le^x diméricos, triméricos y tetraméricos unidos a ceramida eran un detalle generoso de R.R. Schmidt, Universidad de Konstanz, Alemania, y se sintetizaron tal como se ha descrito⁴⁰.

Células

Las DC inmaduras se generaron mediante cultivo de monocitos en RPMI-1640/FCS al 10 % en presencia de IL-4 (500 U/ml, Schering-Plough, Kenilworth, NJ) y GM-CSF (800 U/ml, Schering-Plough) durante 5-8 días⁴¹. Las células K-562, células K-562-DC-SIGN y macrófagos de RAW 264.7 se cultivaron tal como se ha descrito⁴¹.

5 **Unión bacteriana**

Las células de *H. pylori* se marcaron con FITC. Las células (50,000) en TSM con BSA al 0,5 % se incubaron previamente con 20 µg/ml de mAb, 200 µg/ml de manano o EDTA 10 mM durante 10 min a TA. las bacterias marcadas con FITC (10 bacterias/célula) se añadieron y se incubaron durante 45 min a 37 °C. Las muestras se analizaron por citometría de flujo.

Ensayo de adhesión a DC-SIGN-Fc soluble.

15 El ensayo de adhesión a DC-SIGN soluble se realizó con ELISA⁴². Los antígenos (ya sea 3,75 x 10⁶ células bacterianas/pocillo o 5 µg/ml, en el caso de LPS o glicoconjugados) se revistieron en placas de ELISA y la unión la DC-SIGN-Fc soluble (1 µg/ml en TSM) se determinó mediante un ELISA de Ig-Fc anti-humana. Cuando se indicaba, DC-SIGN-Fc se incubó previamente con 20 µg/ml de mAb, 200 µg/ml de manano o EDTA 5 mM durante 10 min a temperatura ambiente.

20 **Inmunohistoquímica**

Después de consentimiento informado de los pacientes, se recogieron 2 biopsias antrales durante gastroscopia. Las criosecciones de tejido se fijaron en acetona y se incubaron con AZN-D1 seguido de HRP anti-ratón. La tinción se realizó con el kit Vectastain para ABC-AP y AEC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se hizo secciones contratinción de las secciones con hematoxilina. En paralelo, la otra biopsia se analizó para infección con *H. pylori* mediante incubación en medio de ureasa durante 12 h. No se observaron diferencias en morfología ni tinción entre individuos no infectados e infectados.

30 **Activación de DC y diferenciación de Th1/Th2**

Para analizar la maduración, las DC (180.000 células) se incubaron con *H. pylori* durante 1 h a una multiplicidad de infección (M.O.I) de 1, 5, 10, 20, se lavaron y se cultivaron durante 20 h. Las células se analizaron para marcadores de maduración (CD80, CD86, CD83, HLA-DR) mediante citometría de flujo y el sobrenadante se recogió para ELISA de citoquinas²². Para la diferenciación de linfocitos T, las DC se cocultivaron con *H. pylori* (M.O.I de 10) durante 2 días, se lavaron y se incubaron con linfocitos T CD45RA+, CD4+ (5.000 linfocitos T/20.000 DC). En paralelo, las DC se analizaron para marcadores de maduración, que se han descrito anteriormente, y la producción de citoquinas después de estimulación con J558 transfectadas con CD40L (detalle generoso de P. Lane, Universidad de Birmingham, UK) en presencia o ausencia de IFN-α (1000 U/ml).

40 Los linfocitos T quiescentes se volvieron a estimular con PMA (10 ng/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y con ionomicina (1 µg/ml, Sigma-Aldrich) durante 6 h, las últimas 5 horas en presencia de brefeldina A (10 µg/ml, Sigma-Aldrich). La producción de una sola célula de IL-4 e IFN-γ se determinó mediante citometría de flujo intracelular⁴³.

45 **Resultados**

Se ha demostrado que DC-SIGN tiene una especificidad de carbohidrato para carbohidratos que contienen manosa, antígenos de Lewis y estructuras que contienen GlcNAc (Figura 33, 34, 63-66). Los inventores han demostrado que la especificidad de carbohidrato de L-SIGN es diferente ya que no reconoce estructuras de carbohidrato de antígeno de Lewis mientras que reconoce estructuras de alta manosa (Figura 33 y 34). El homólogo murino, mSIGNR1, reconoce antígenos similares a DC-SIGN de alta manosa y antígenos de Lewis, pero también tiene especificidad para antígenos de Lewis sialilados al contrario que DC-SIGN y L-SIGN (Figura 33 y 34).

DC-SIGN es una lectina de tipo C expresan altamente en particular en células dendríticas. Su función es reconocer y procesar antígenos y presenta esto de forma muy eficaz en moléculas de la clase I y II de MHC.

55 Durante mucho tiempo se ha pensado que DC-SIGN es un receptor de reconocimiento de patógenos que reconoce patógenos para activar el sistema inmune, pero tal como parece en la actualidad, todos los patógenos de la larga lista de patógenos que se dirigen a DC-SIGN persisten y escapan de la inmunidad mediante diferentes mecanismos. Los inventores tienen ahora cuatro ejemplos de patógenos que se dirigen a DC-SIGN para sobrevivir en el hospedador.

- 60 1. HIV-1 y VHC se dirigen a DC-SIGN para 'escondarse' dentro de las DC y escapar de la ruta intracelular al compartimento lisosómico.
2. La secreción de ManLAM mediante micobacterias se dirige a DC-SIGN para inducir la maduración de las DC inducida por la modulación negativa de TLR, y la inducción de IL-10.
- 65 3. El patógeno gástrico humano, *Helicobacter pylori*, persiste: Algunas variantes de fase de lipopolisacárido modulan el equilibrio de Th1/Th2 mediante la interacción con la lectina de célula dendrítica, DC-SIGN.

4. Lactobacillus se dirige a DC-SIGN en DC e induce linfocitos T reguladores, la inhibición del reconocimiento de Lactobacillus mediante DC-SIGN reduce el estado regulador de los linfocitos T. Por lo tanto, supone que DC-SIGN es un receptor que reconoce 'normalmente' al autoantígeno a tolerar (Annual Review Immunology, 2004). Los inventores han demostrado aquí que el direccionamiento de DC-SIGN mediante lactobacilos puede inducir

5 ciertamente los linfocitos T reguladores. Además, parece que DC-SIGN también puede reconocer al antígeno tumoral CEA (CD66e) en particular Lewis X e Y. Estos antígenos tumorales se pueden secretar y suprimir la activación de DC de una manera similar a la de ManLam de *Mycobacteria tuberculosis*.
 La integración de DC con granulocitos se pone en evidencia por el hecho de que DC-SIGN reconoce CD66a y
 10 CD11b en granulocitos. En particular, se reconoce el antígeno de Lewis X en estas moléculas. De este modo, DC-SIGN funciona como un receptor de la adhesión celular que media interacciones celulares de los granulocitos con DC. Esta función de adhesión celular entre granulocitos y células dendríticas nunca se ha informado pero es probable que la interacción de granulocitos y DC sea esencial para formar un puente entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativas de una manera tal que el granulocito pase los agentes infecciosos a las DC aumentando una respuesta inmune adecuada. En particular el granulocito activa y madura las DC, induciendo la
 15 regulación positiva de las citoquinas y las moléculas coestimuladoras que es necesaria para la migración de DC y el inicio de la respuesta inmune adaptativa. La interacción de DC con granulocitos también se observa *in vivo* en la situación de la enfermedad de Crohn. Un nuevo patógeno que interactúa con DC-SIGN en las DC es *Neisseria Meningitidis*. Las variantes de cepa demuestran que en particular interactúa un mutante IgtB de una cepa que contiene resto de GlcNAc con extremo en reposo. Otros experimentos (Figura 66) demuestran que la DC-SIGN
 20 también reconoce a GlcNAc.

Referencias

1. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, y K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811.
2. Banchereau, J. y R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-52.
3. Lanzavecchia, A. y F. Sallusto. 2001. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106: 263-6.
4. Steinman, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-96.
5. Palucka, K. y J. Banchereau. 2002. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol* 14: 420-31.
6. Underhill, D. M. y A. Ozinsky. 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 14: 103-10.
7. Thoma-Uszynski, S., S. Stenger, O. Takeuchi, M. T. Ochoa, M. Engele, P. A. Sieling, P. F. Barnes, M. Rollinghoff, P. L. Bolcskei, M. Wagner, S. Akira, M. V. Norgard, J. T. Belisle, P. J. Godowski, B. R. Bloom, y R. L. Modlin. 2001. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 291:1544-7.
8. Figdor, C. G., Y. van Kooyk, y G. J. Adema. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature Rev Immunol* 2: 77-84.
9. Mahnke, K., M. Guo, S. Lee, H. Sepulveda, S. L. Swain, M. Nussenzweig, y R. M. Steinman. 2000. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151: 673-84.
10. Engering, A., T. B. Geijtenbeek, S. J. van Vliet, M. Wijers, E. van Liempt, N. Demaurex, A. Lanzavecchia, J. Franssen, C. G. Figdor, V. Pigué, e Y. van Kooyk. 2002. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 168: 2118-26.
11. Drickamer, K. 1999. C-type lectin-like domains. *Curr Opin Struct Biol* 9: 585-90.
12. Geijtenbeek, T. B. H., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. F. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, e Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100: 587-97.
13. Astarie-Dequeker, C., E. N. N'Diaye, V. Le Cabec, M. G. Rittig, J. Prandi, e I. Maridonneau-Parini. 1999. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun* 67: 469-77.
14. Geijtenbeek, T. B. H., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. F. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk, y C. G. Figdor. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100: 575-85.
15. Geijtenbeek, T. B. H., Krooshoop, D. J. E. B., Bleijs, D. A., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C. F., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C. G., y van Kooyk, Y. DC-SIGN/ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nature Immunology* 1 (4), 353-357. 2000.
16. van Remoortere, A., Hokke, C. H., van Dam, G. J., van Die, I., Deelder, A. M., y van den Eijnden, D. H. (2000) *Glycobiology* 10, 601-609
17. Nyame, A. K., Leppanen, A. M., Debose-Boyd, R., y Cummings, R. D. (1999) *Glycobiology* 9, 1029-1035
18. Nyame, K. A., Leppanen, A., Bogitsh, B. J., y Cummings, R. D. (2000) *Exp Parasitol* 96, 202-212
19. Geijtenbeek, T. B. H., van Kooyk, Y., van Vliet, S. J., Renes, M. H., Raymakers, R. A. P., y Figdor, C. G. (1999) *Blood* 94, 754-764
20. Appelmelk, B. J., M. A. Monteiro, S. L. Martin, A. P. Moran, y C. M. Vandenbroucke-Grauls. 2000. Why *Helicobacter pylori* has Lewis antigens. *Trends Microbiol* 8: 565-70.
21. Srivatsan, J., Smith, D. F., y Cummings, R. D. (1992) *J Biol Chem* 267, 20196-20203
22. Alvarez, C. P., F. Lasala, J. Carrillo, O. Muniz, A. L. Corbi, y R. Delgado. 2002. C-Type Lectins DC-SIGN and L-

- SIGN Mediate Cellular Entry by Ebola Virus in cis and in trans. *J Virol* 76: 6841-4.
23. Geijtenbeek, T. B. H., van Duijnhoven, G. C. F., van Vliet, S. J., Krieger, E., Vriend, G., Figdor, C. G., y van Kooyk, Y. (2002) *J Biol Chem* 277, 11314-11320
- 5 24. Kudryashov, V., P. W. Glunz, L. J. Williams, S. Hintermann, S. J. Danishefsky, y K. O. Lloyd. 2001. Toward optimized carbohydrate-based anticancer vaccines: epitope clustering, carrier structure, and adjuvant all influence antibody responses to Lewis(y) conjugates in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3264-9.
25. Keizer, G.D., J. Borst, C.G. Figdor, H. Spits, F. Miedema, C. Terhorst, y J.E. De Vries. 1985. Biochemical and functional characteristics of the human leukocyte membrane antigen family LFA-1, Mo-1 and p150, 95. *Eur J Immunol* 15: 1142-8.
- 10 26. Caligaris-Cappio, F., G. Pizzolo, M. Chilosi, L. Bergui, G. Semenzato, L. Tesio, L. Morittu, F. Malavasi, M. Gobbi, R. Schwarting, y a.l. et. 1985. Phorbol ester induces abnormal chronic lymphocytic leukemia cells to express features of hairy cell leukemia. *Blood* 66: 1035-42.
27. Negrini, R., L. Lisato, I. Zanella, L. Cavazzini, S. Gullini, V. Villanacci, C. Poiesi, A. Albertini, y S. Ghielmi. 1991. *Helicobacter pylori* infection induces antibodies cross-reacting with human gastric mucosa. *Gastroenterology* 101: 437-45.
- 15 28. Sallusto, F. y A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alfa. *J Exp Med* 179: 1109-18.
29. Hed, J., G. Hallden, S.G. Johansson, y P. Larsson. 1987. The use of fluorescence quenching in flow cytofluorometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *J Immunol Methods* 101: 119-25.
- 20 30. Colmenares, M., A. Puig-Kroger, O.M. Pello, A.L. Corbi, y L. Rivas. 2002. Dendritic Cell (DC)-specific Intercellular Adhesion Molecule 3 (ICAM-3)-grabbing Nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type Surface Lectin in Human DCs, Is a Receptor for *Leishmania Amastigotes*. *J Biol Chem* 277: 36766-9.
31. Chatterjee, D. y K.H. Khoo. 1998. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology* 8: 113-20.
- 25 32. Redpath, S., P. Ghazal, y N.R. Gascoigne. 2001. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol* 9: 86-92.
33. Demangel, C., A.G. Bean, E. Martin, C.G. Feng, A.T. Kamath, y W.J. Britton. 1999. Protection against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection using *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin-infected dendritic cells. *Eur J Immunol* 29: 1972-9.
- 30 34. Henderson, R.A., S.C. Watkins, y J.L. Flynn. 1997. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 159: 635-43.
- 35 35. Inaba, K., M. Inaba, M. Naito, y R.M. Steinman. 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 178: 479-88.
36. Tsuji, S., M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, I. Azuma, A. Hayashi, K. Toyoshima, y T. Seya. 2000. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun* 68: 6883-90.
- 40 37. Geijtenbeek, T.B., G.C. van Duijnhoven, S.J. van Vliet, E. Krieger, G. Vriend, C.G. Figdor, e Y. van Kooyk. 2002. Identification of different binding sites in the dendritic cell- specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV- 1. *J Biol Chem* 277: 11314-20.
38. Bashirova, A.A., T.B.H. Geijtenbeek, G.C.F. van Duijnhoven, S.J. van Vliet, J.B. Eilering, M.P. Martin, L. Wu, T.D. Martin, N. Viebig, P.A. Knolle, V.N. KewalRamani, Y. van Kooyk, y M. Carrington. 2001. A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (dc-sign)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes hiv-1 infection. *J Exp Med* 193: 671-8.
- 45 39. Geijtenbeek 2000 como se proporciona en cualquier parte en esta lista.
40. Alvarez, C.P., F. Lasala, J. Carrillo, O. Muniz, A.L. Corbi, y R. Delgado. 2002. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol* 76:6841-4.
- 50

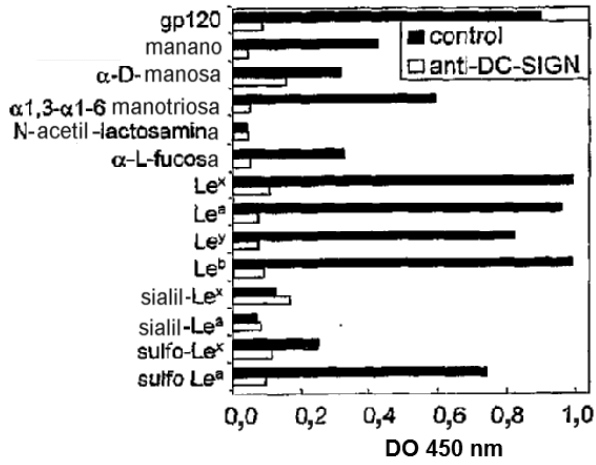
REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un glicoconjugado que comprende un antígeno tumoral y un antígeno de Lewis x no sialilado capaz de unirse a DC-SIGN en una célula que presenta antígeno para la preparación de una composición para la estimulación de una respuesta inmune frente al antígeno tumoral en un individuo.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el antígeno tumoral es un péptido o glicolípido capaz de presentarse en el contexto de la clase I o la clase II o C1b de MHC.
- 10 3. Una composición para uso en la estimulación de una respuesta inmune frente a un antígeno tumoral en un individuo, comprendiendo dicha composición un glicoconjugado del antígeno tumoral y un antígeno de Lewis x no sialilado capaz de unirse a DC-SIGN en una célula que presenta antígeno.
- 15 4. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 3 en la que el antígeno tumoral es un péptido o glicolípido capaz de presentarse en el contexto de la clase I o la clase II o C1b de MHC.

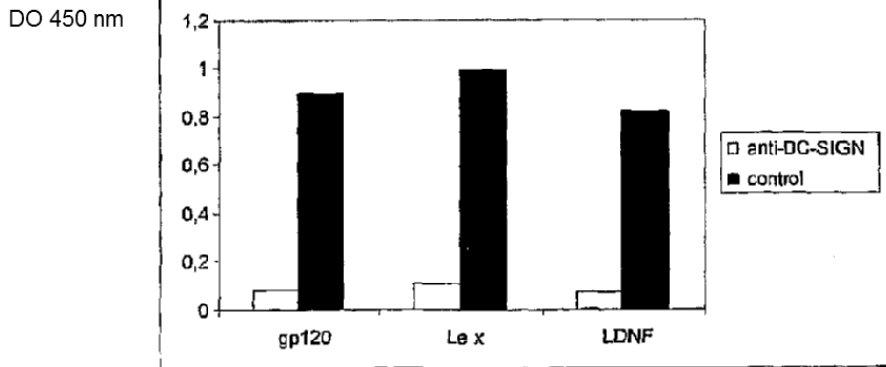
Fig. 1

A es tabla de estructuras

B



C



D

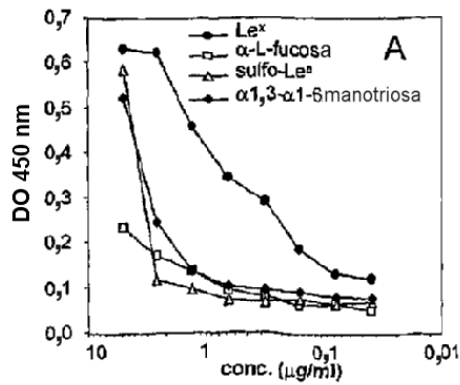
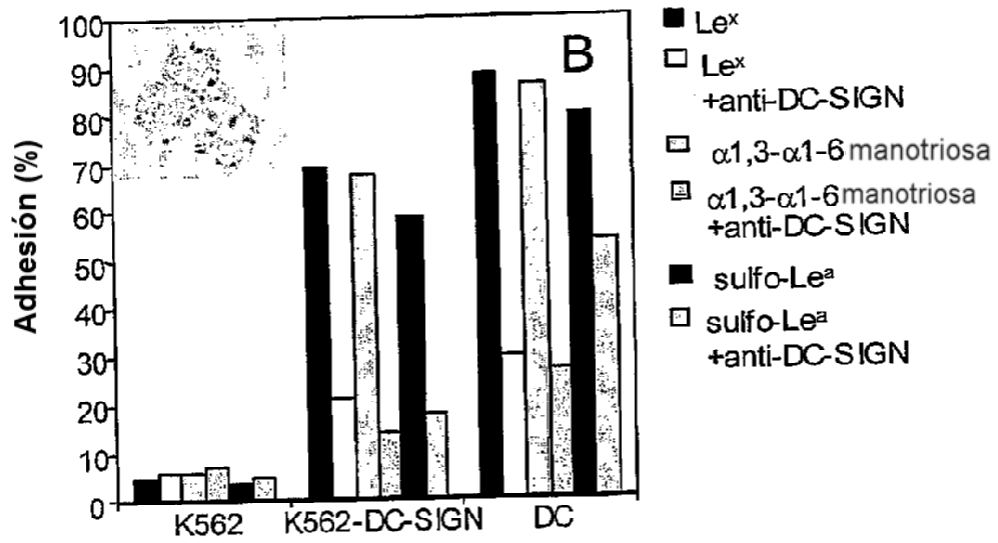


Fig. 2



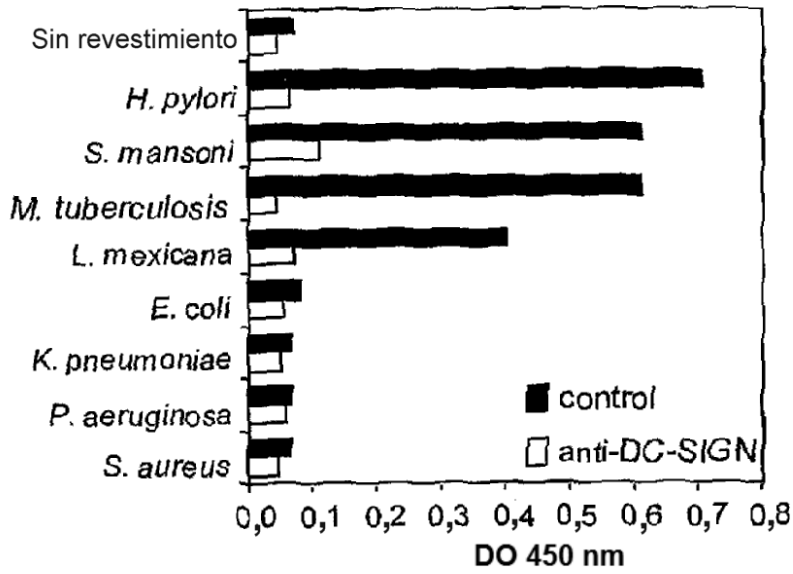


Fig. 3A

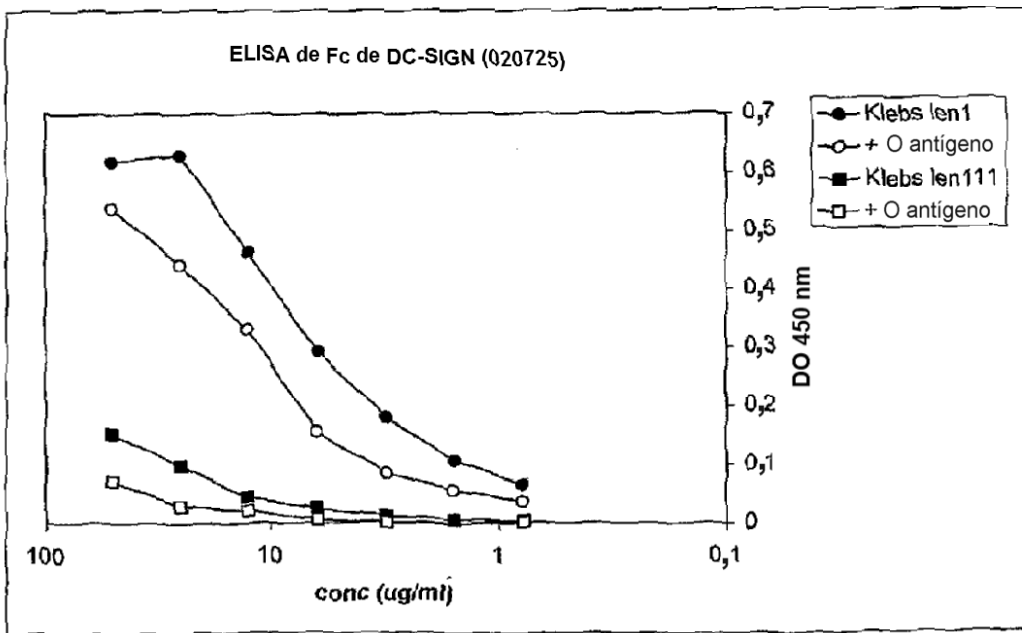


Fig. 3B

Fig. 4

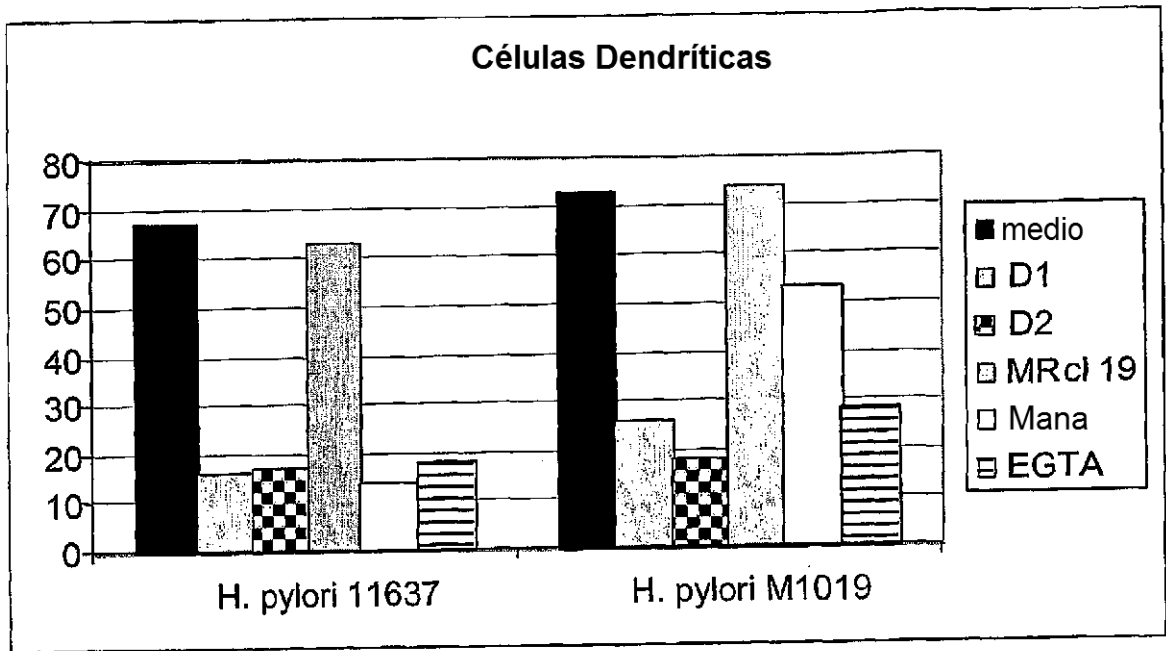


Fig. 5

Verde: CD107a
Rojo: Le^X-PAA-bio

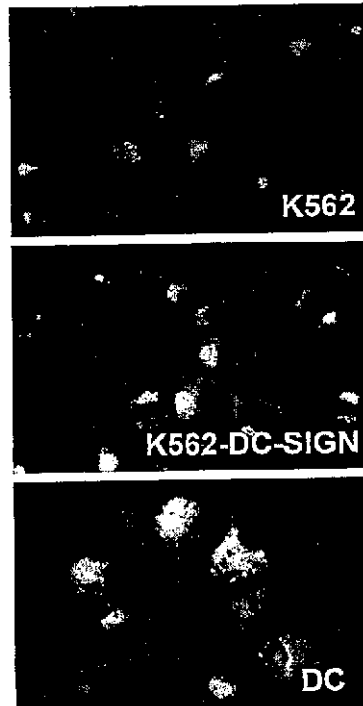


Fig. 6

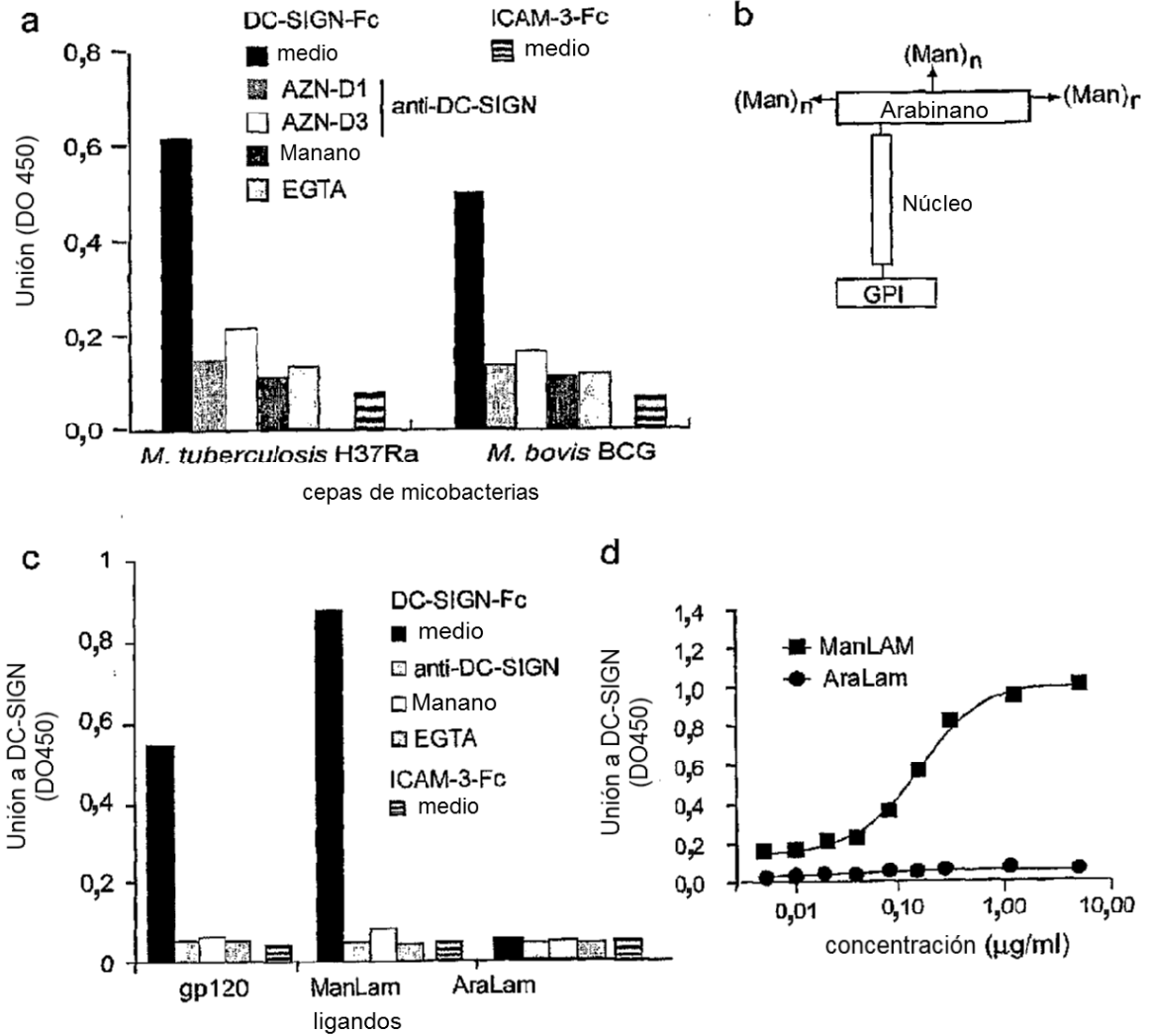


Fig. 7

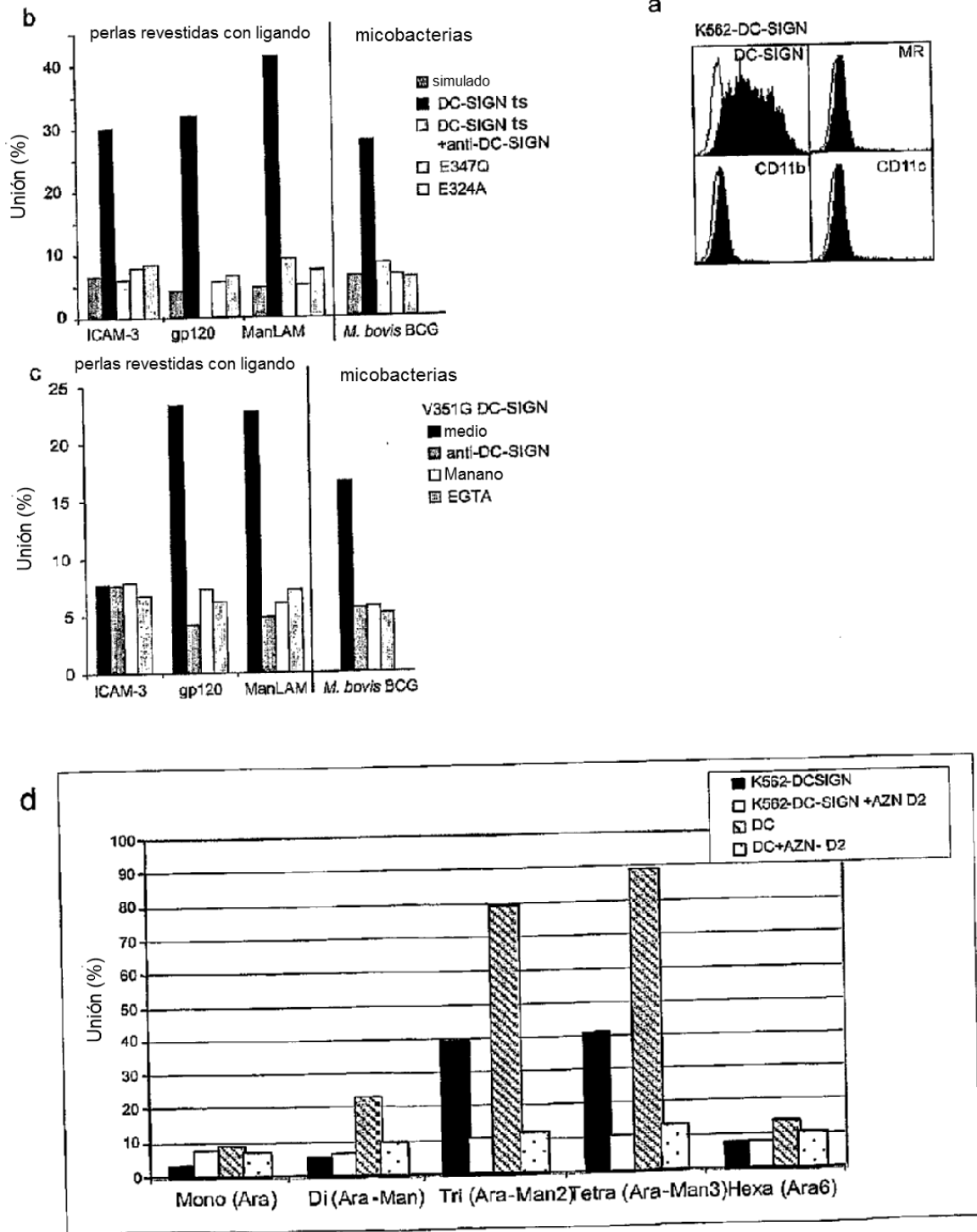


Fig. 8

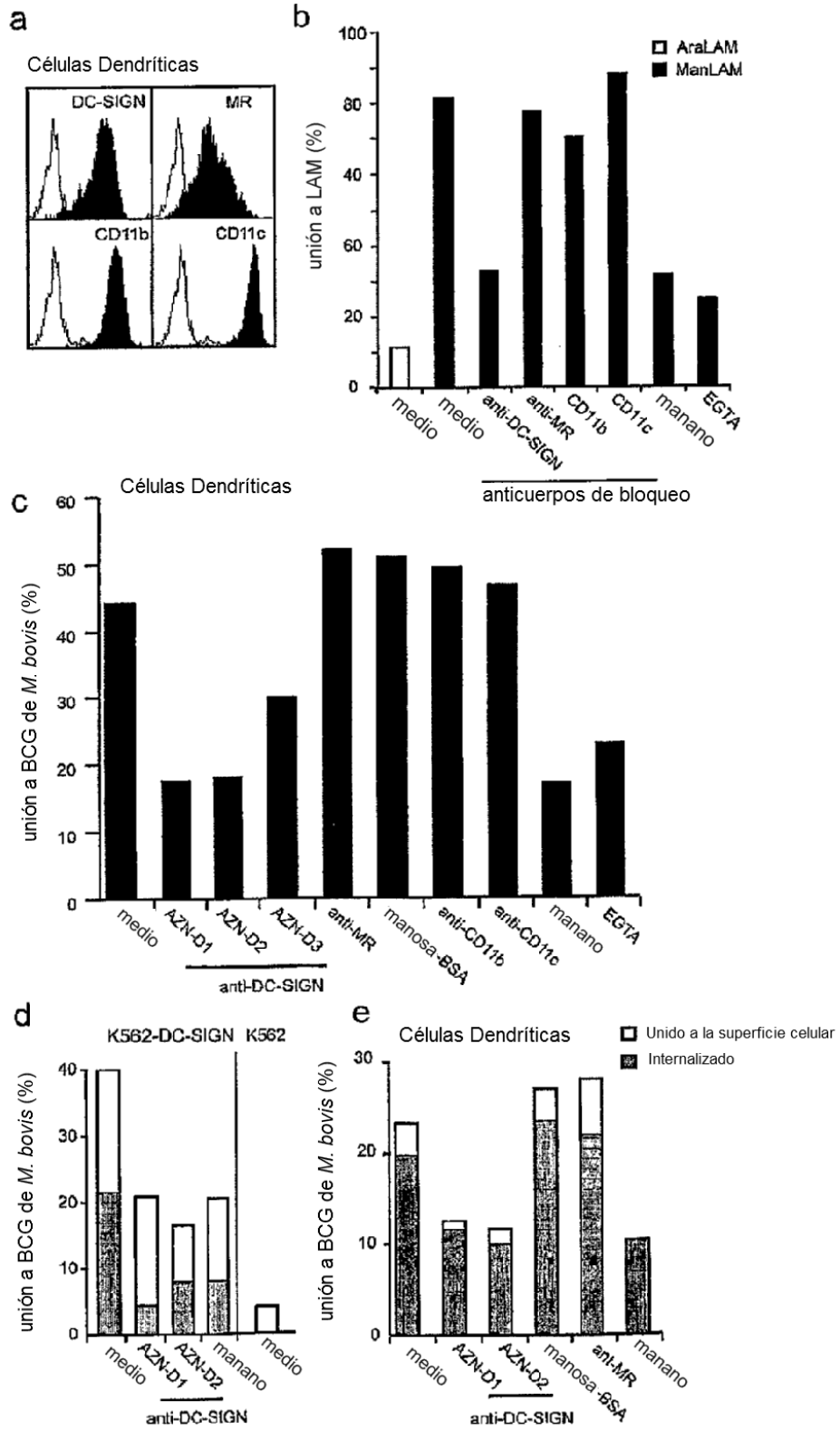


Fig. 9

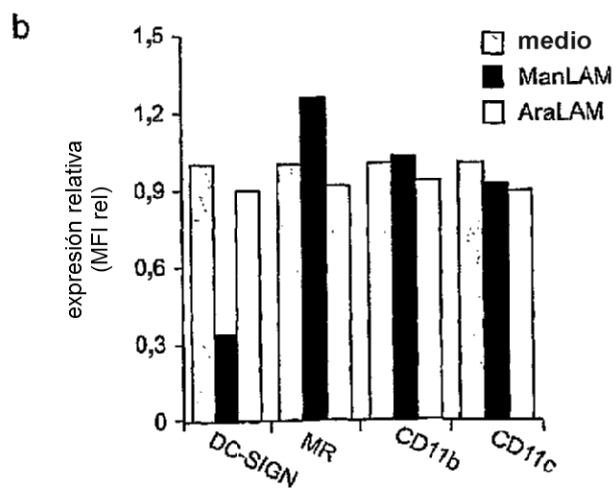
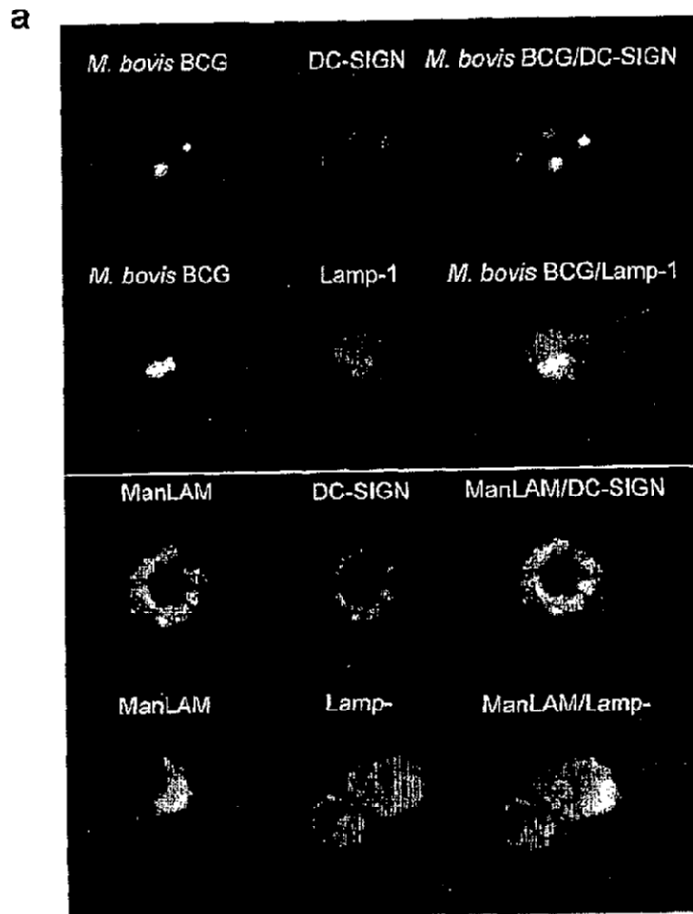


Fig. 10

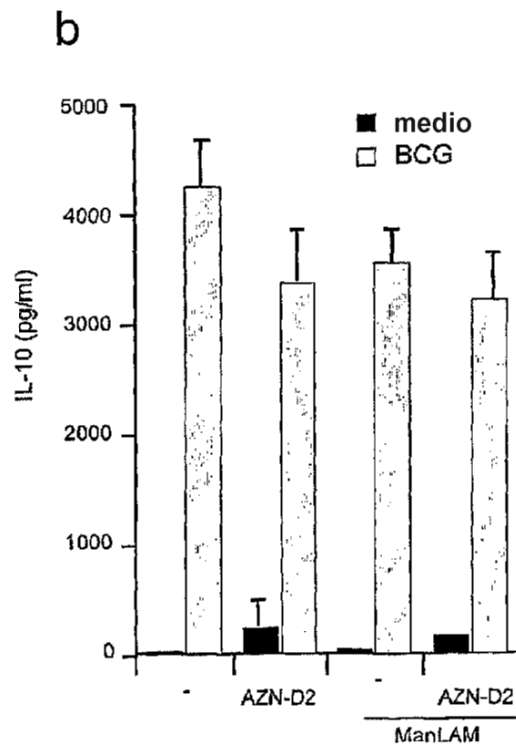
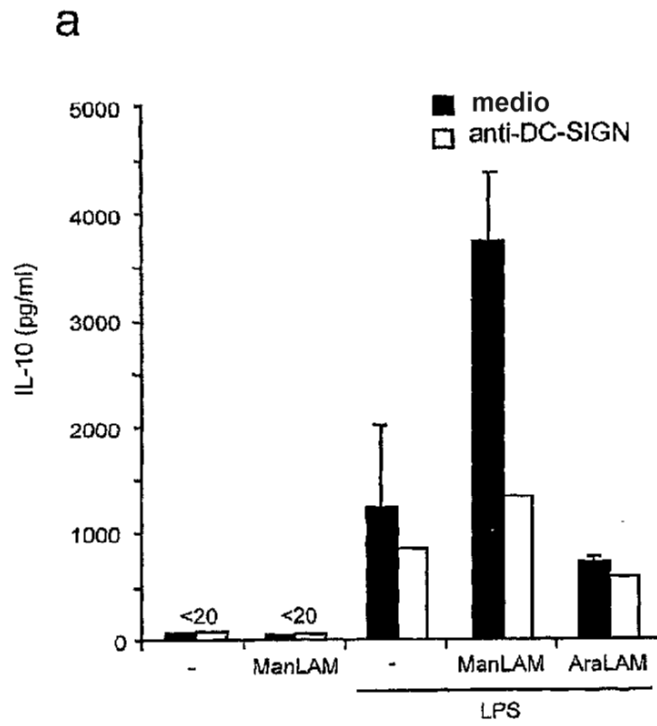


Fig. 11

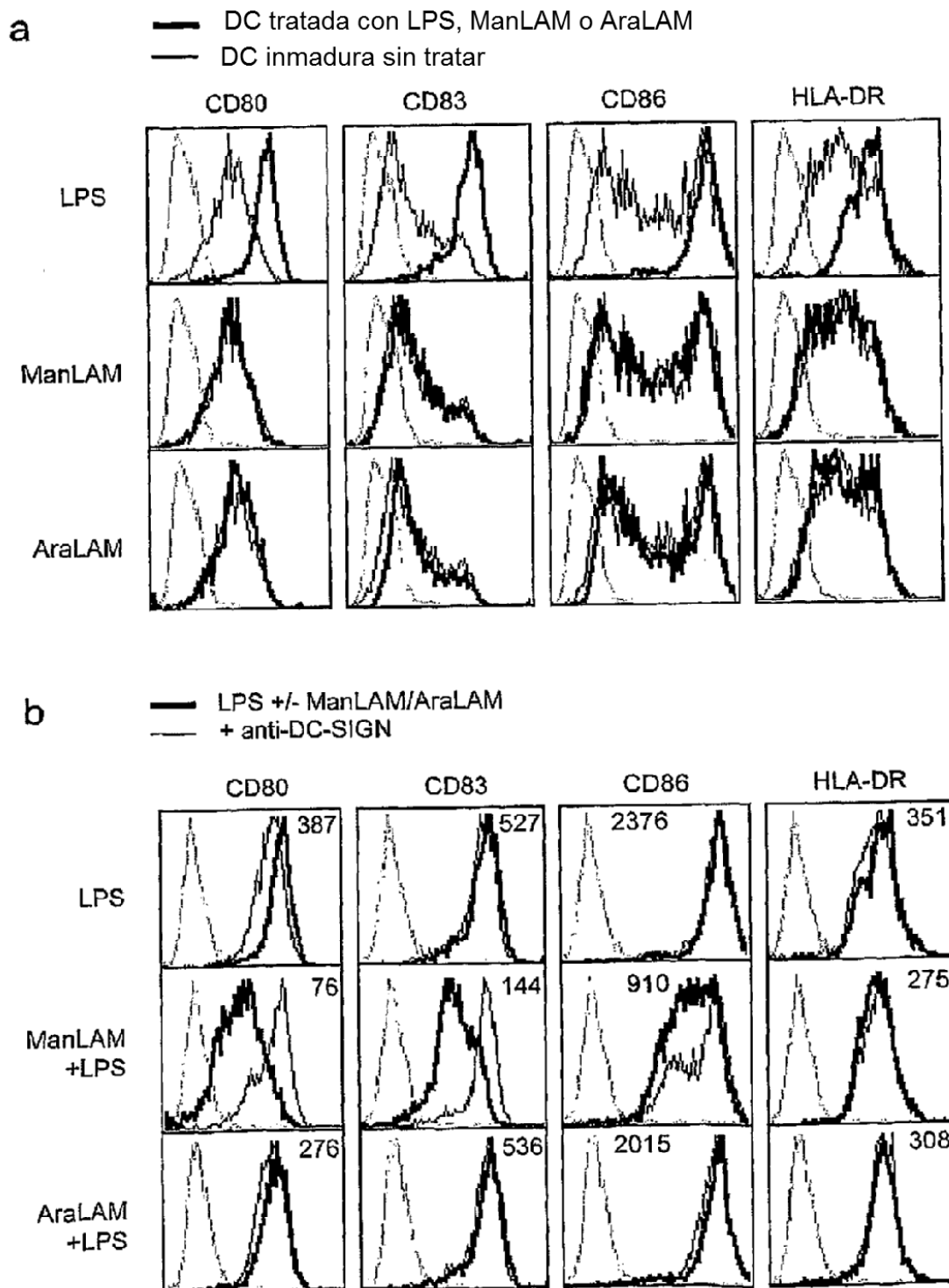


Fig. 12

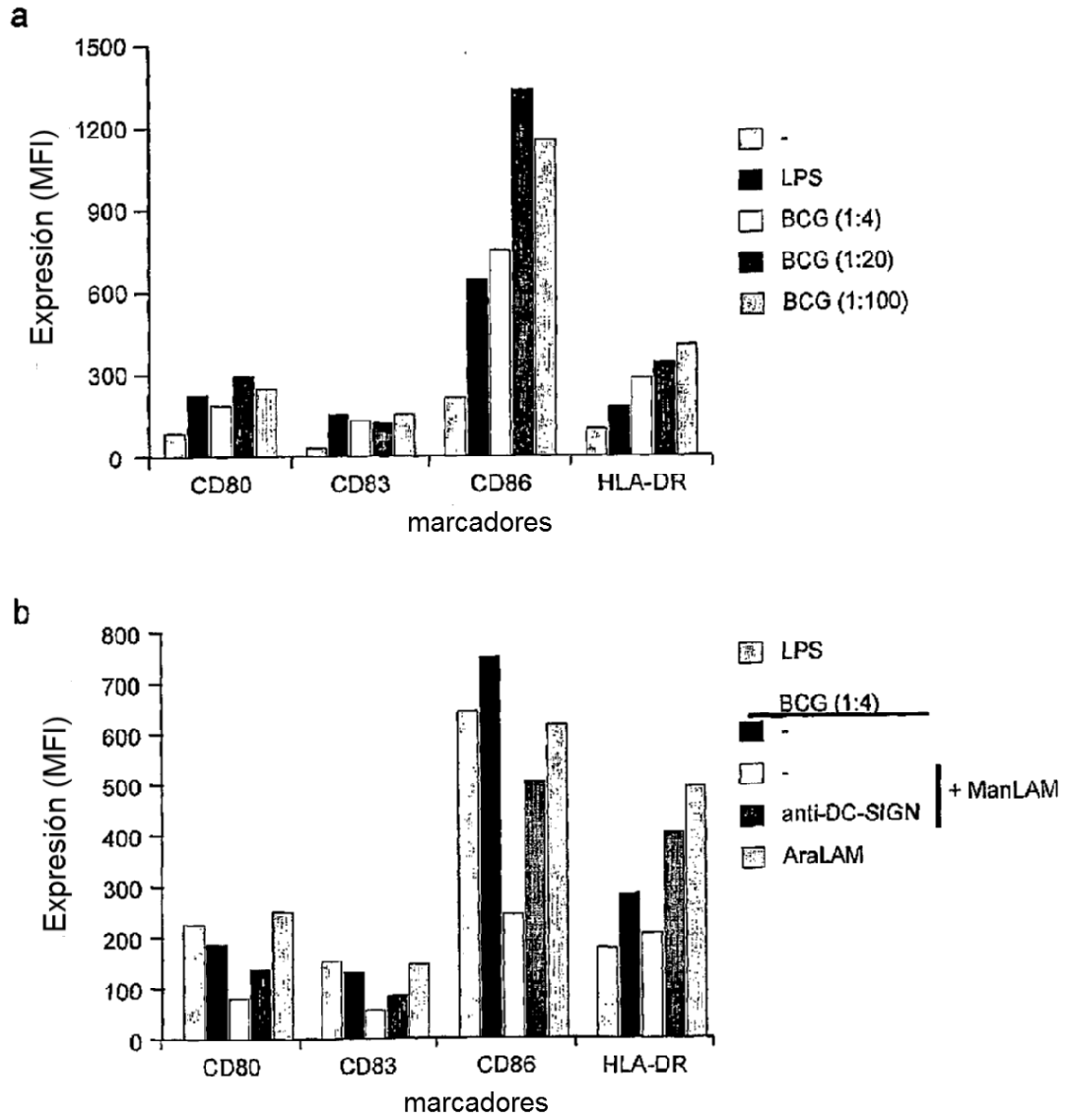
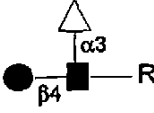
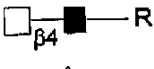
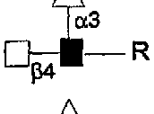
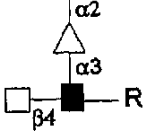


Fig. 13

Antígenos de carbohidrato en SEA de *S. mansoni*

Epítipo de carbohidrato	Abreviatura	MAb anti-glicano
	Lewis-X	CB10 (32)
	LDN	SMLDN1.1 (31)
	LDNF	SMLDNF1 (4)
	LDN-DF	114-5B1-A (12)

Gal
 GlcNAc
 GalNAc
 Fucosa

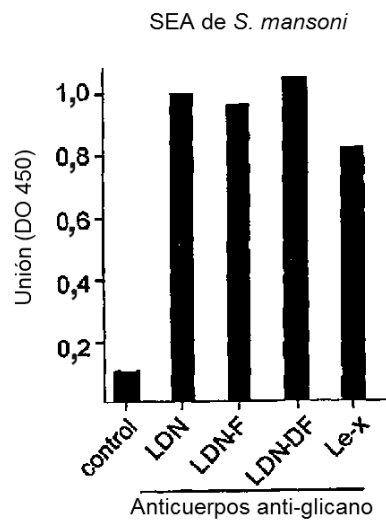


Fig. 14

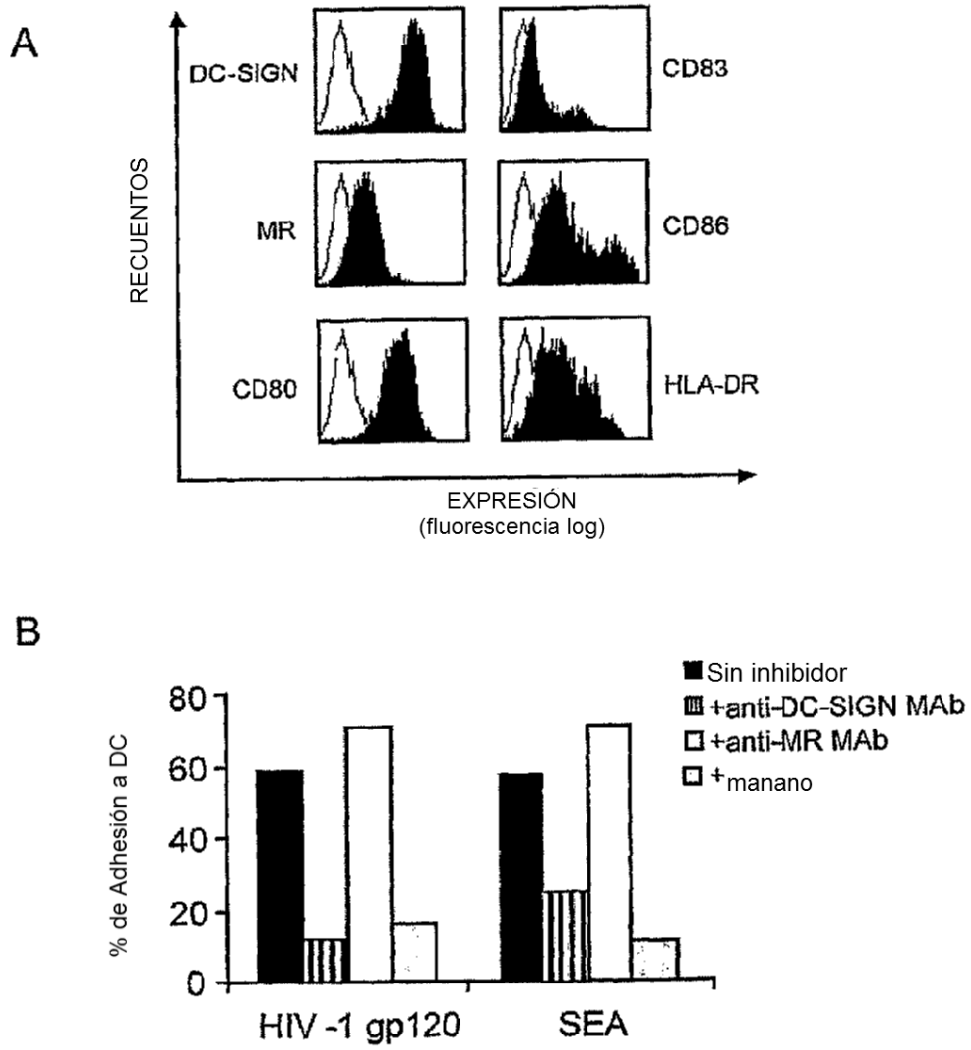


Fig. 15

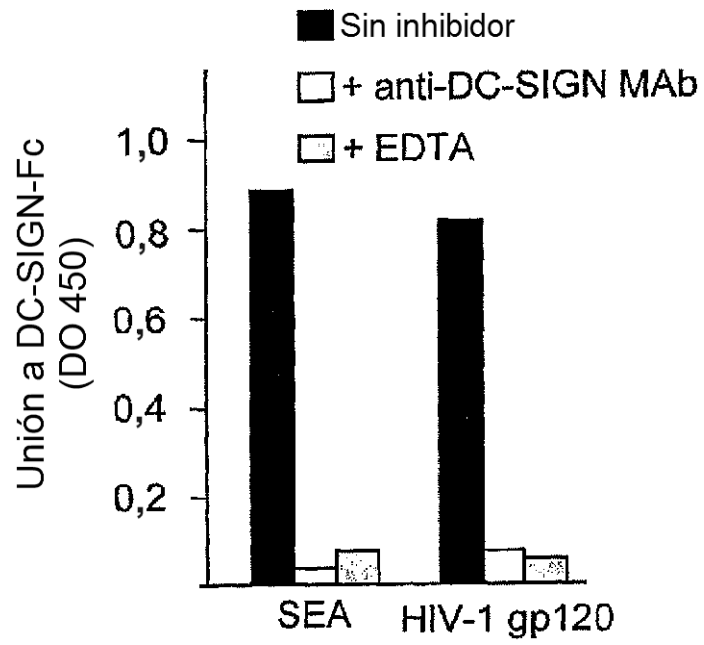


Fig. 16

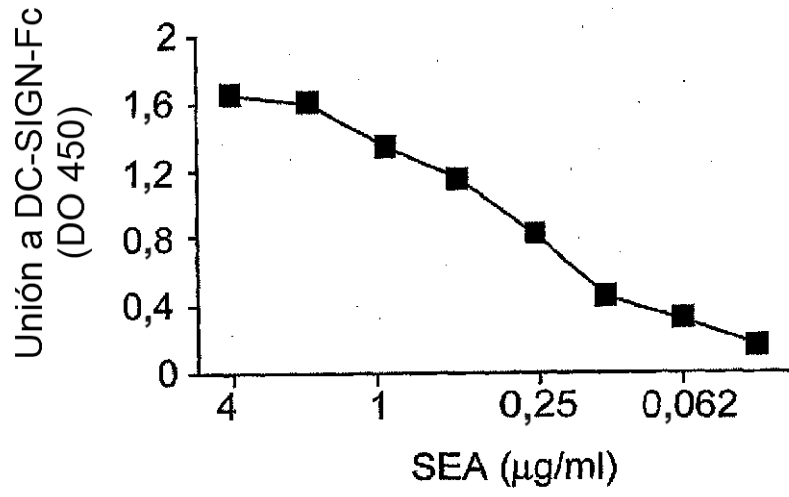


Fig. 17

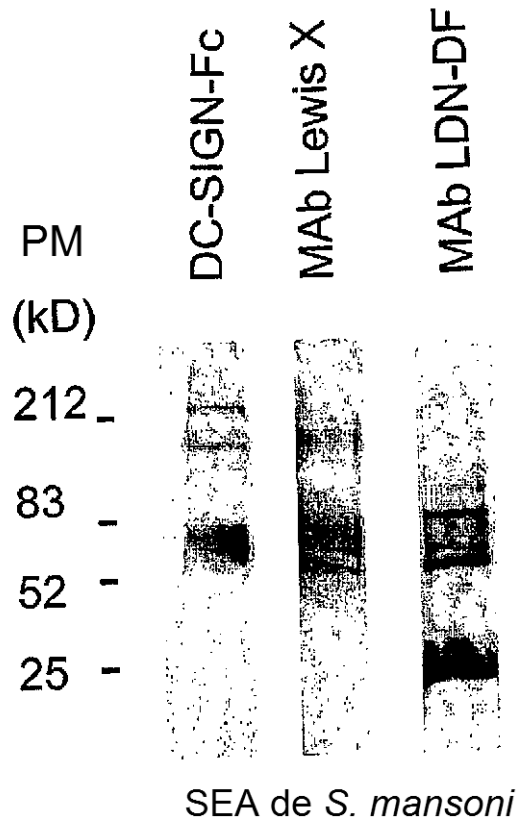


Fig. 18

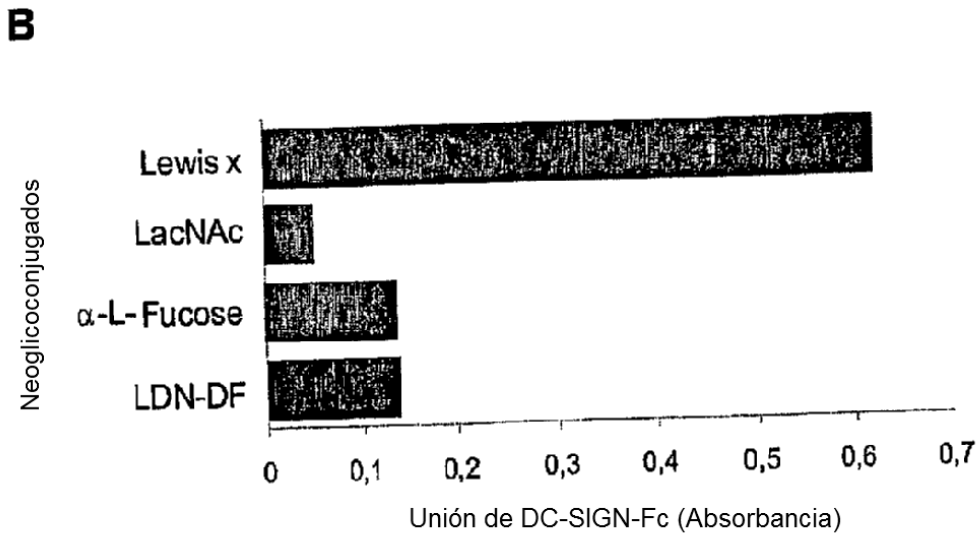
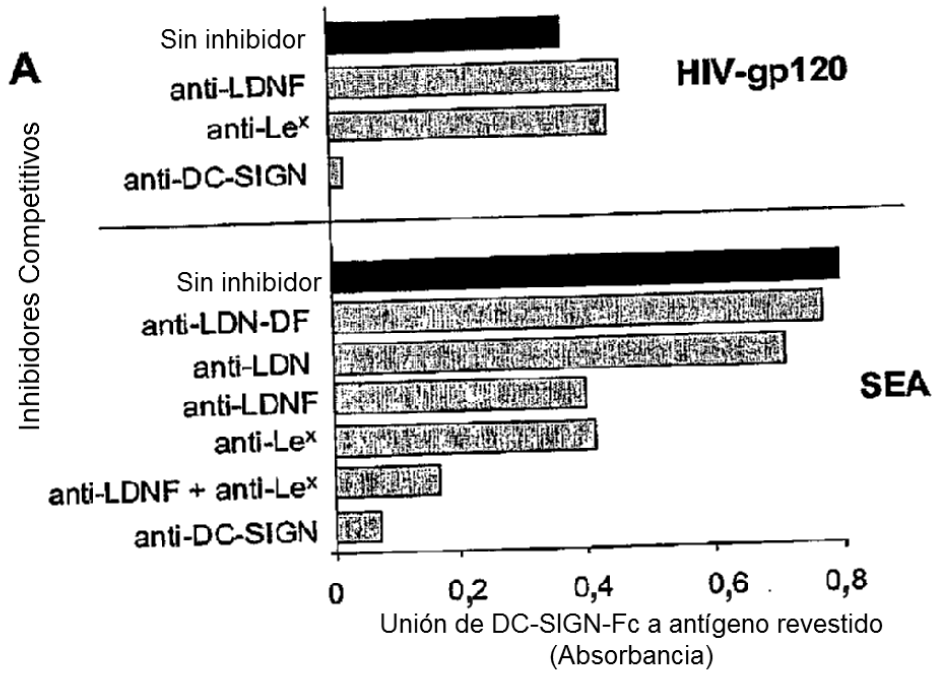


Fig. 19

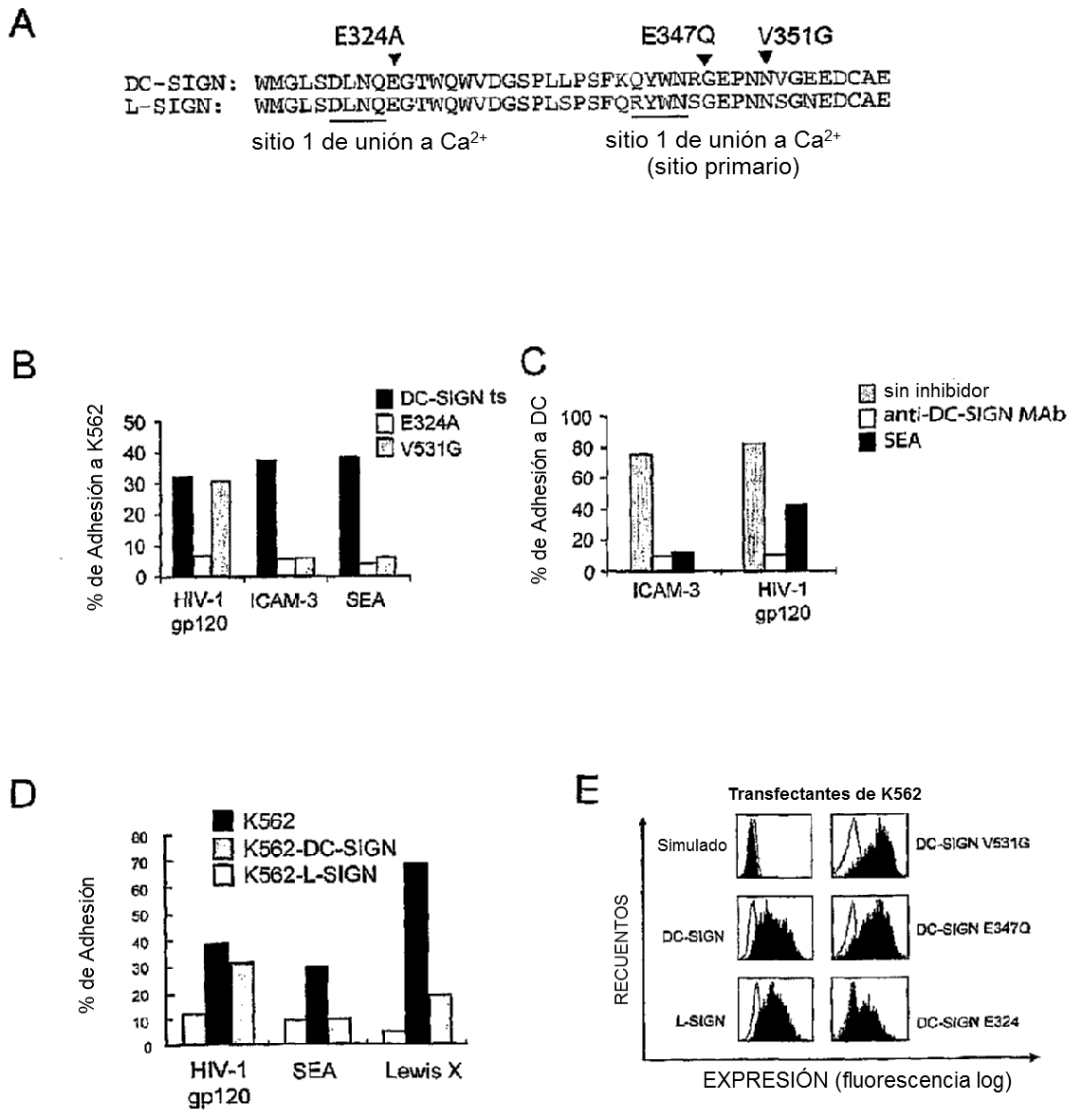


Fig. 20A

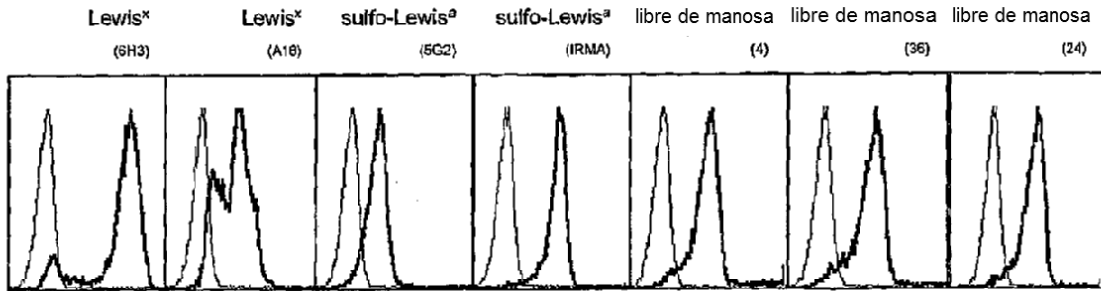


Fig. 20B

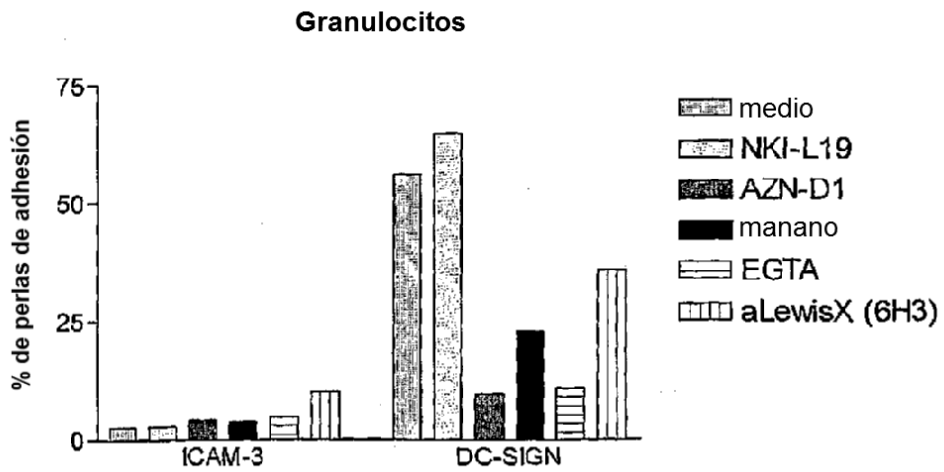


Fig. 21

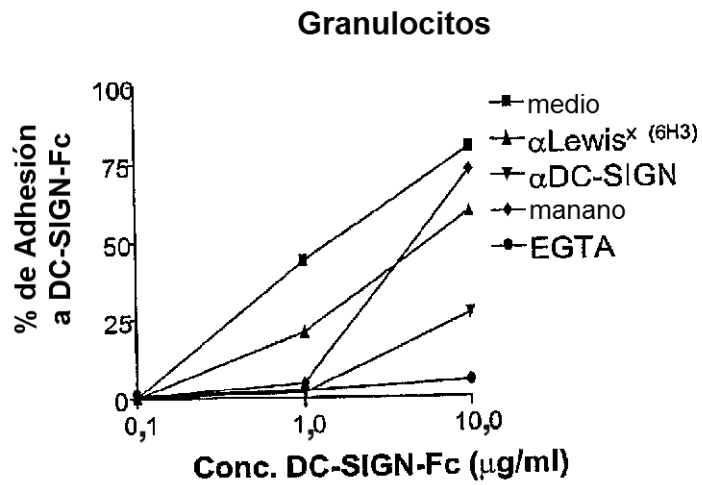
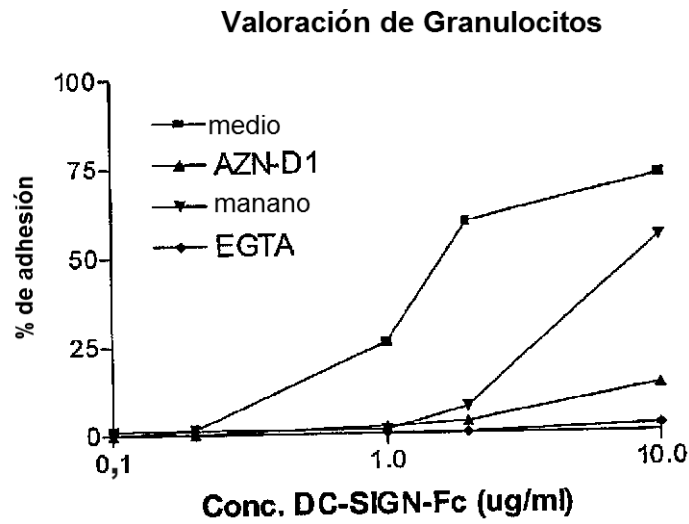


Fig. 22A

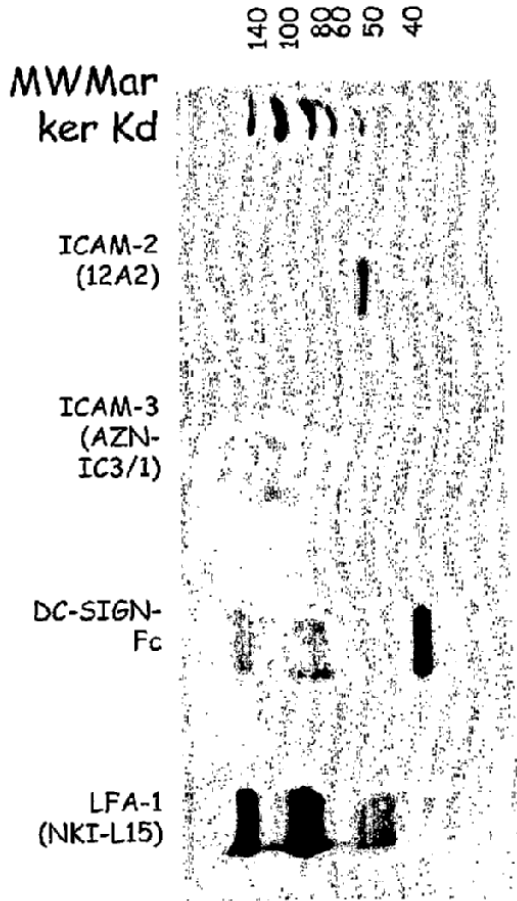


Fig. 22B

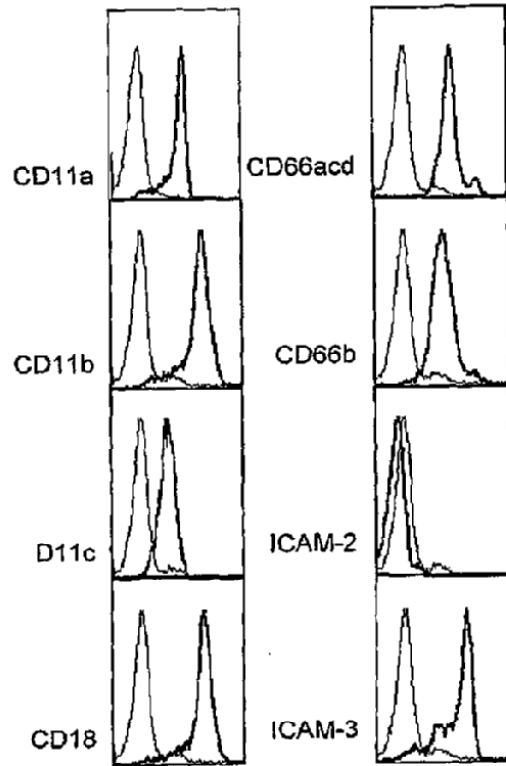


Fig. 22C

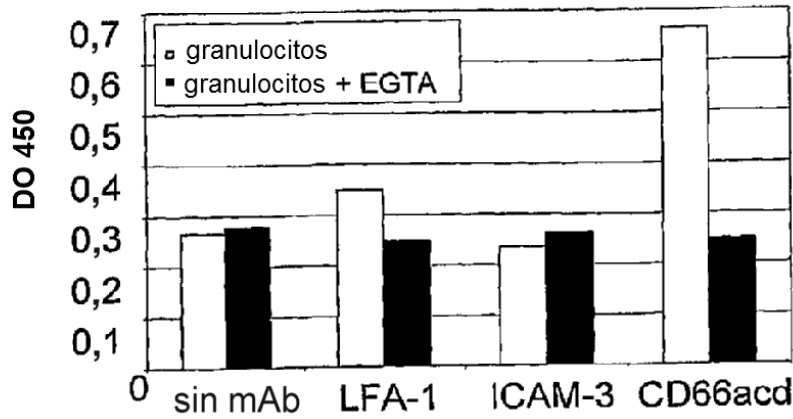


Fig. 23

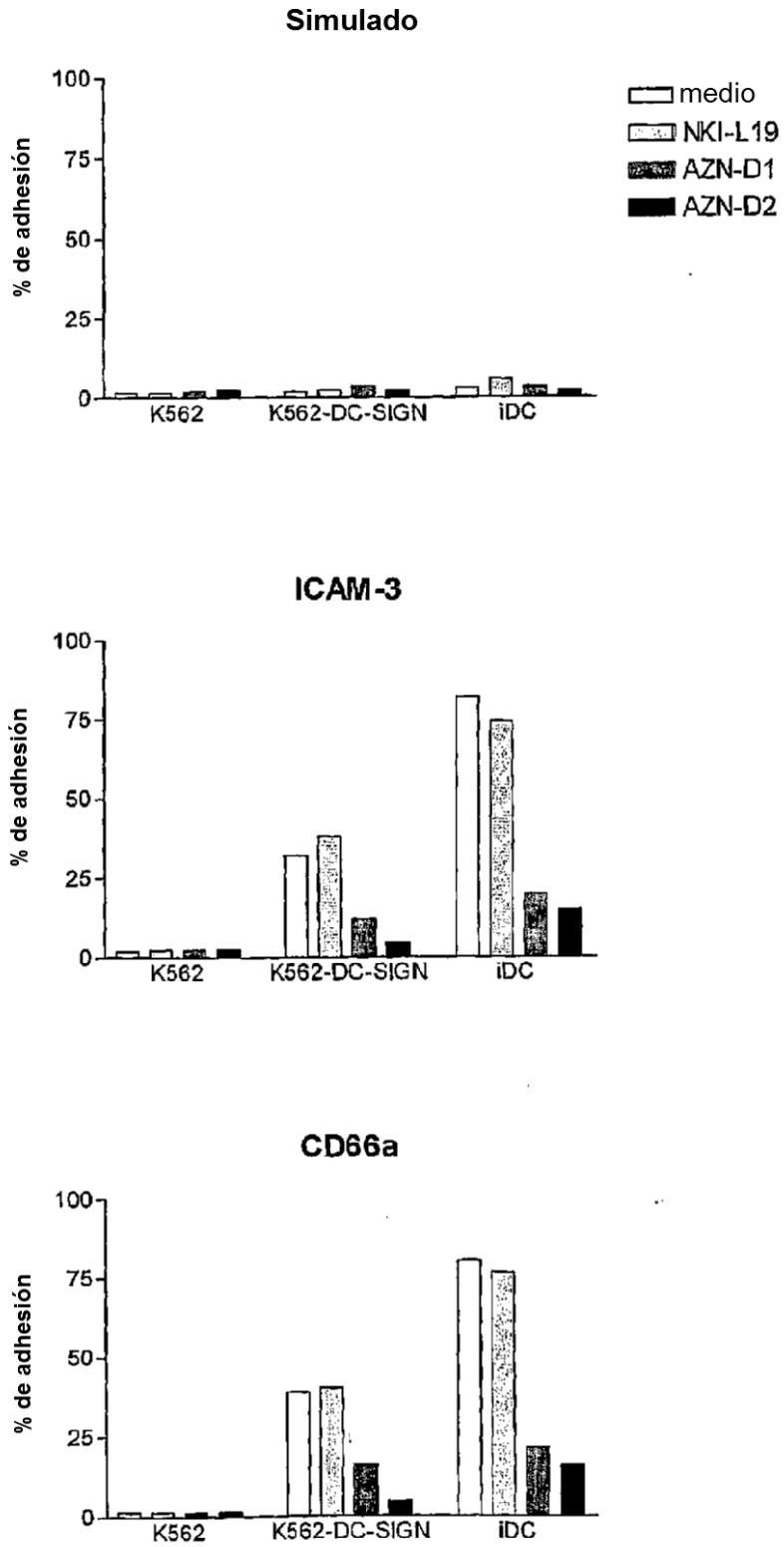


Fig. 24

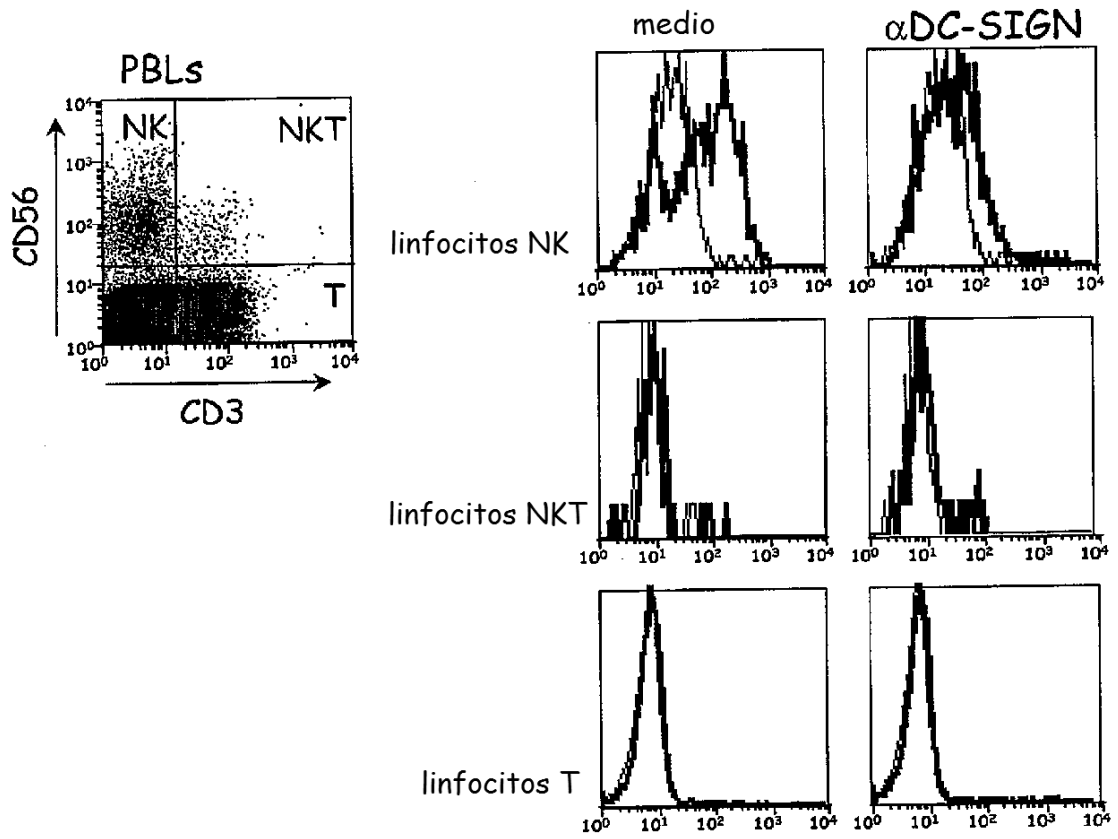


Fig. 25

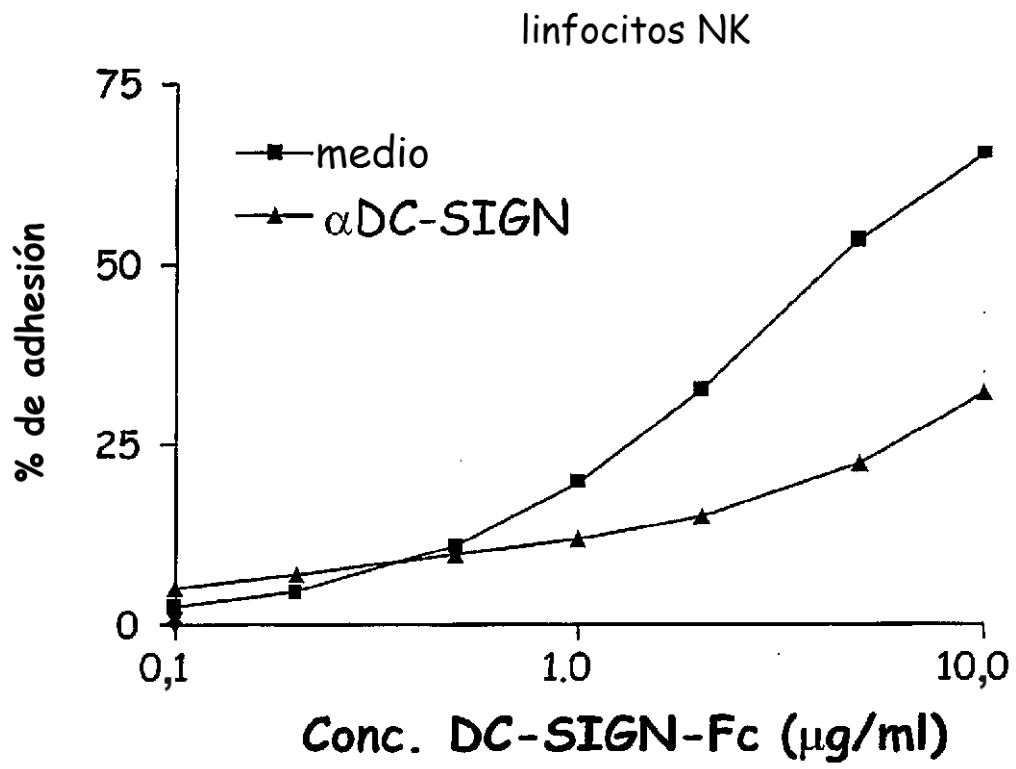


Fig. 26

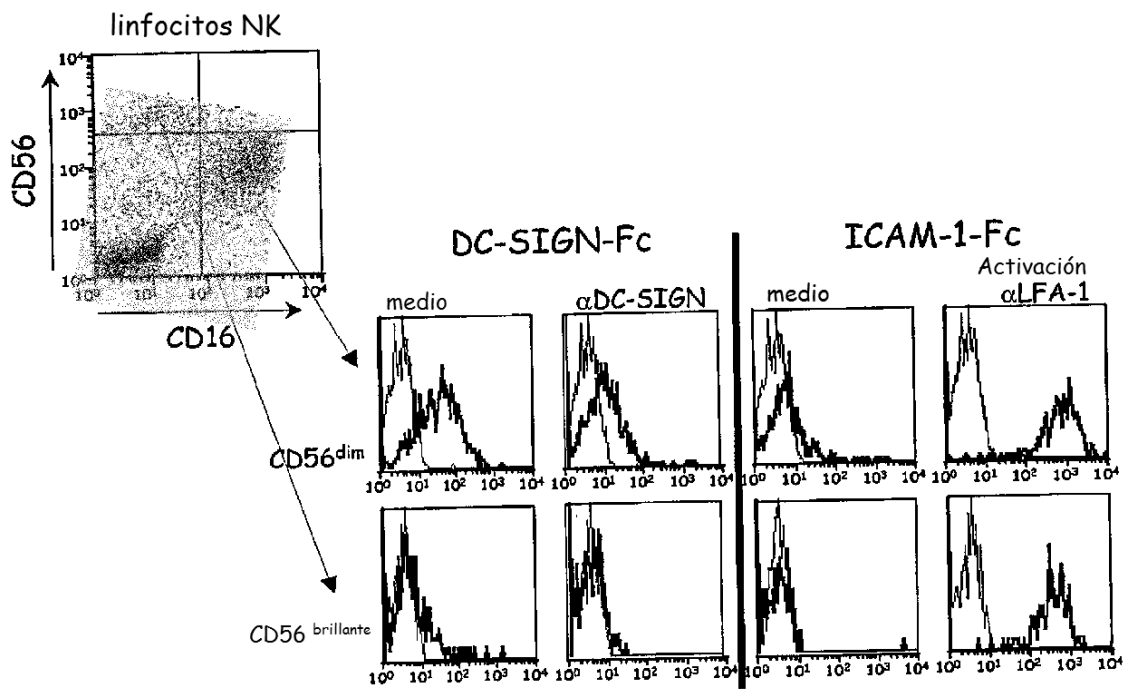
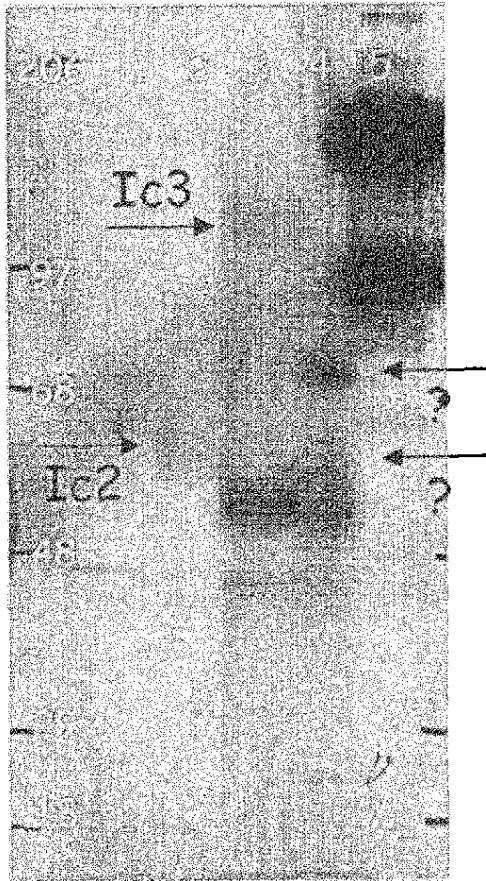


Fig. 27



1. control
2. ICAM-2
3. ICAM-3
4. ligando de DC-SIGN
5. LFA-1

→ el ligando de DC-SIGN
se une a CAM 2?
y al ligando de 75 kD
en linfocitos NK

Fig. 28

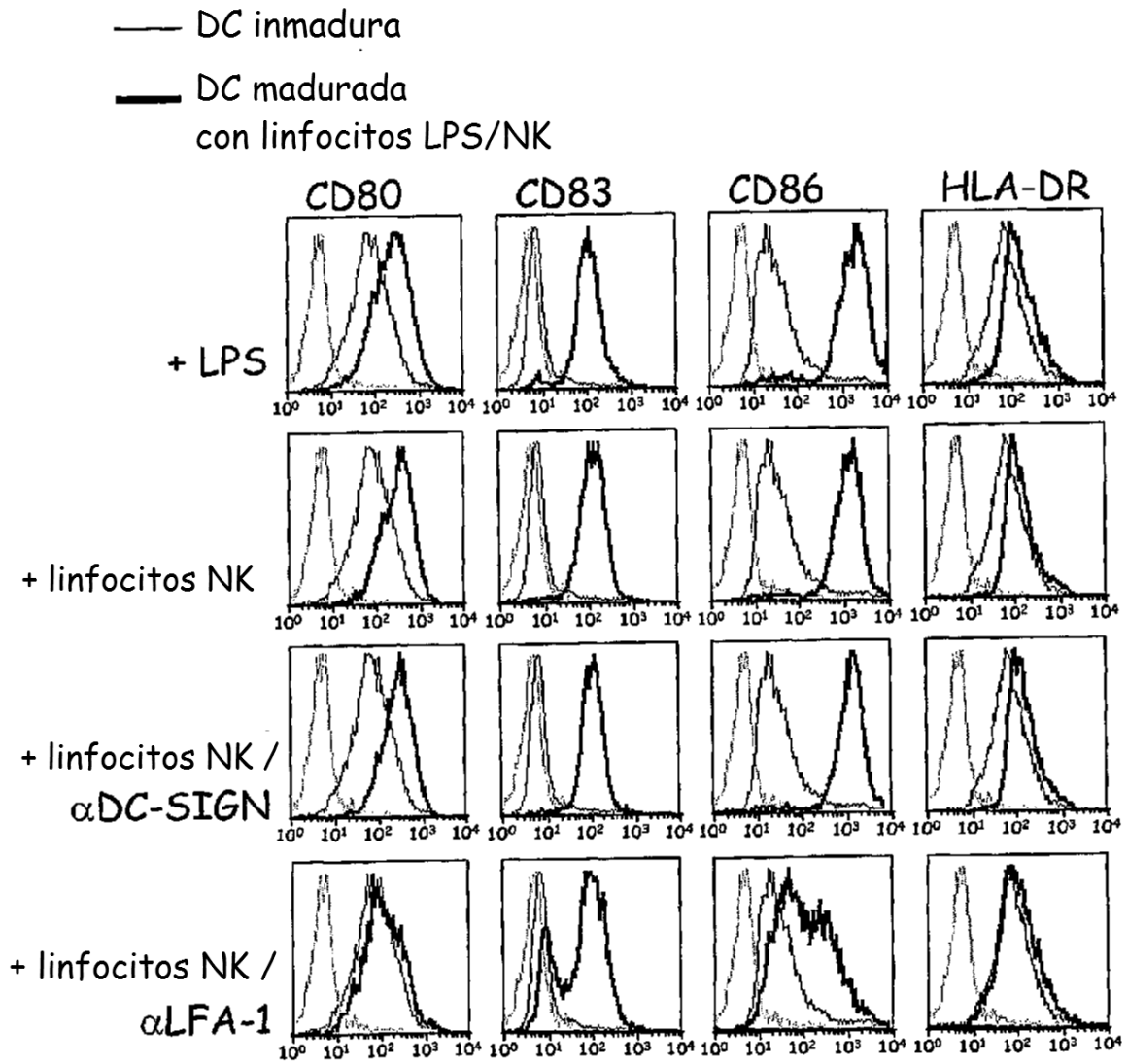


Fig. 29

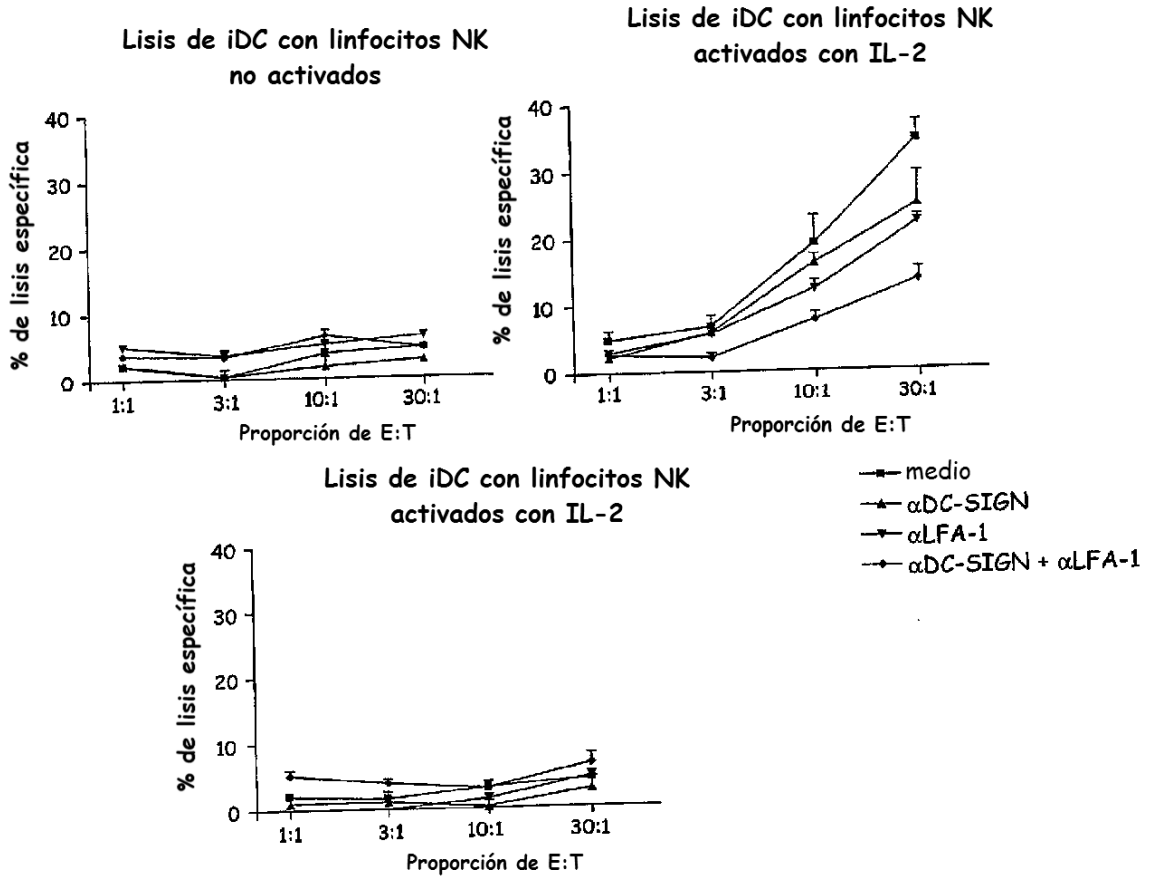


Fig. 30

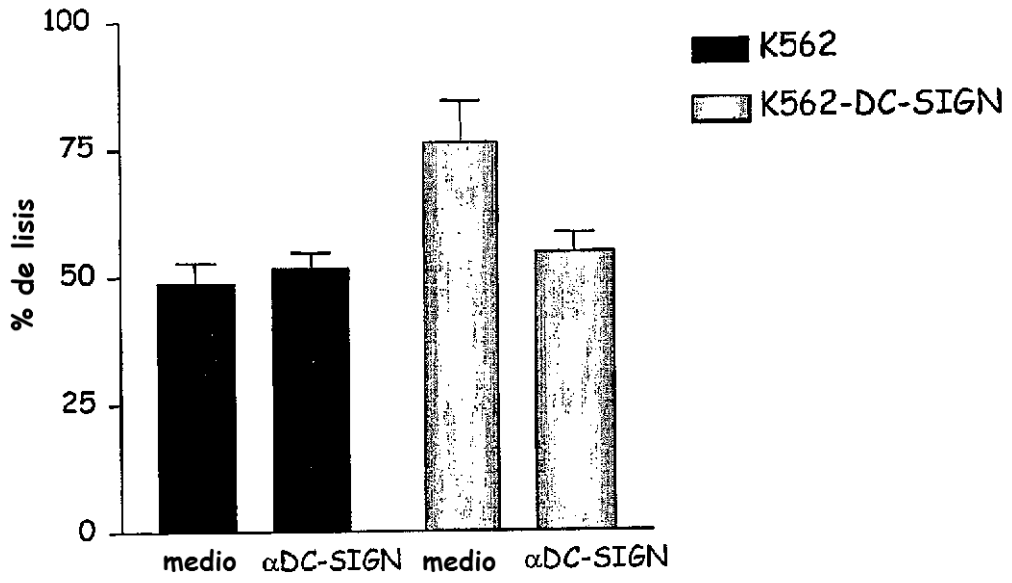
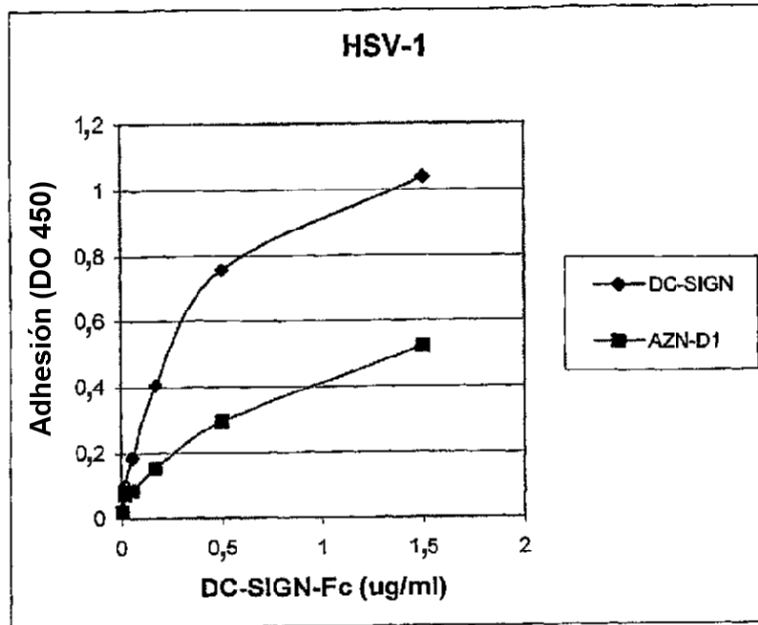


Fig. 31

Unión a VHS-1



Unión a VHS-2

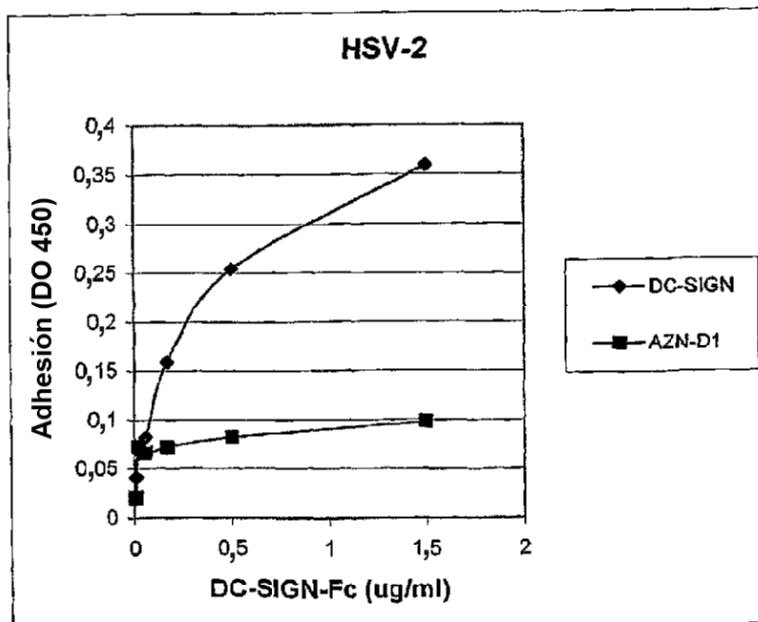
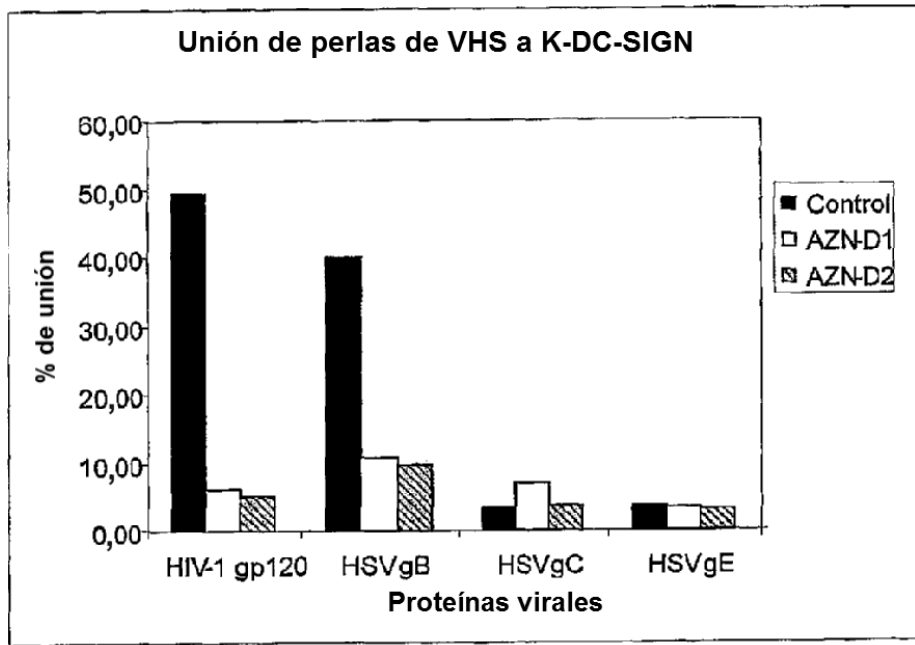


Fig. 32

A



B

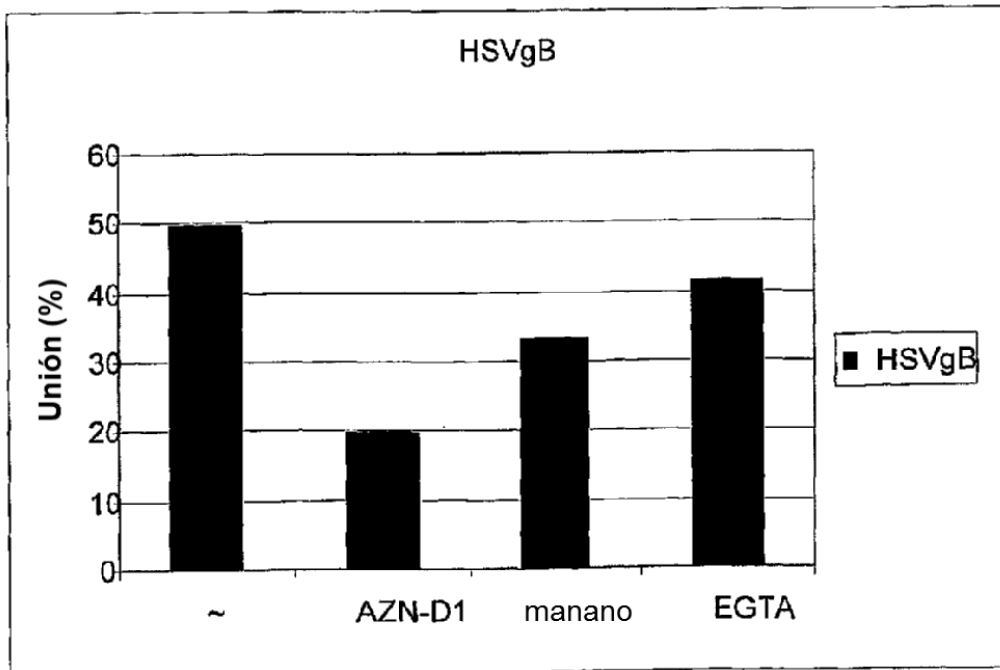
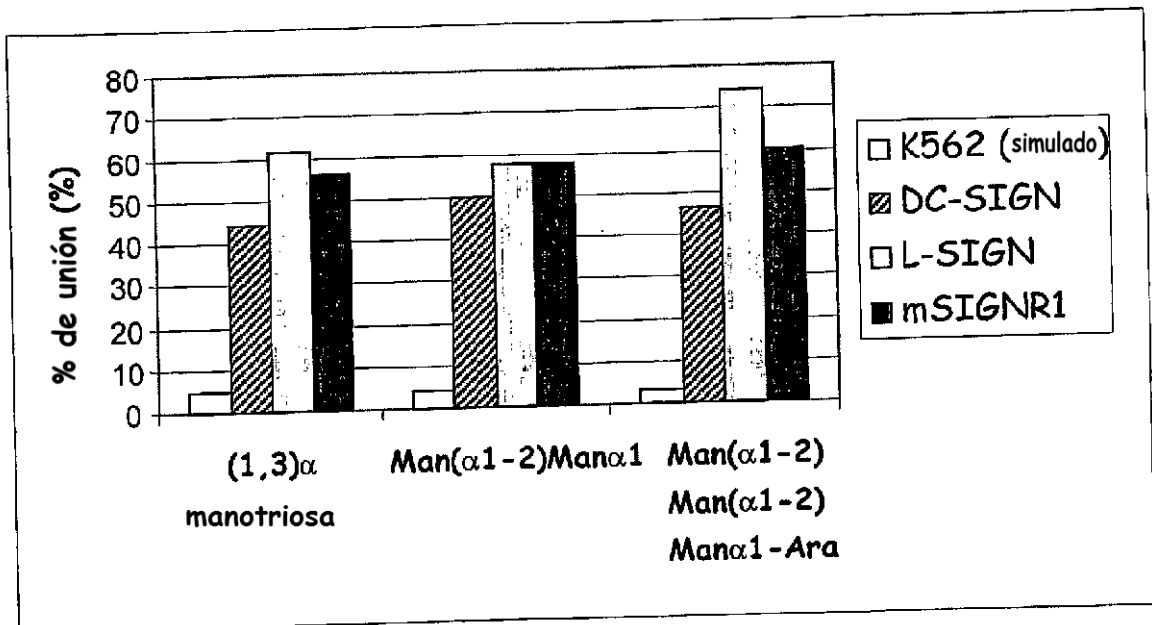


Fig. 33A

mSIGNRI se une a carbohidratos
que contienen manosa,
similar a DC-SIGN y L-SIGN



DC-SIGN, L-SIGN y mSIGNR1 se unen de forma diferente a antígenos de Lewis

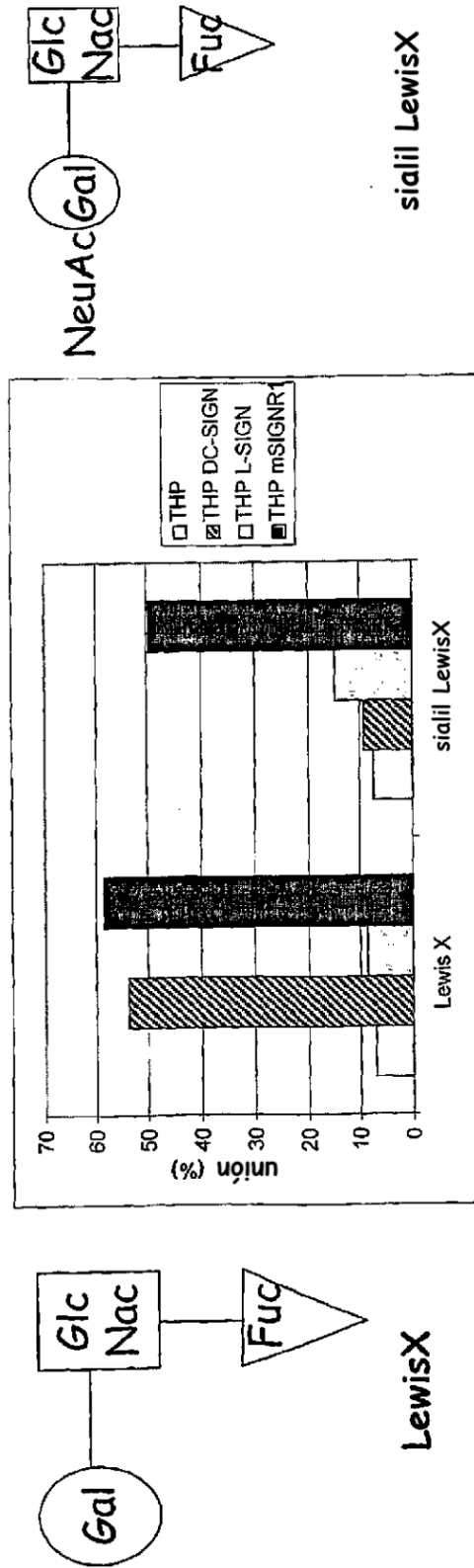


Fig. 33B

Fig. 33C

**Especificidad de carbohidrato
de DC-SIGN, L-SIGN y mSIGNR1**

	DC-SIGN	L-SIGN	mSIGNR1
LewisX	+	-	+
sialil LewisX	-	-	+
sulfo LewisX	+	-	+
LewisY	+	+	+
LewisA	+	+	+
sialil LewisA	-	-	+
sulfo LewisA	+	+	+
LewisB	+	+	+

Fig. 34

Los patógenos con carbohidratos que contienen manosa se unen a mSIGNR1

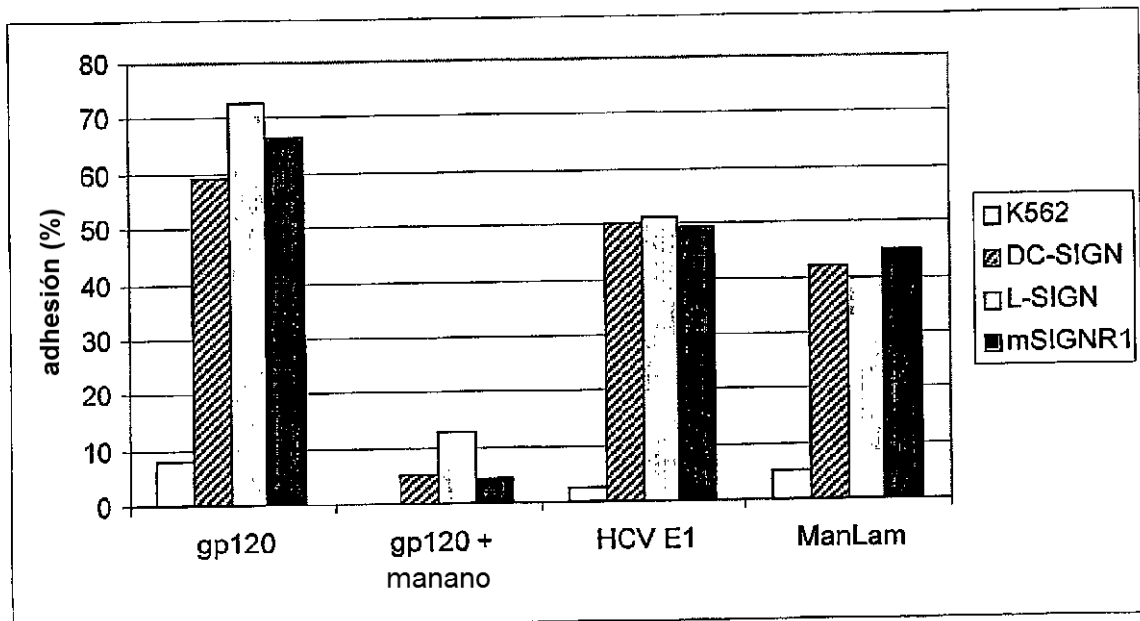


Fig. 35

DC-SIGN-Fc se une a proteínas de envoltura de VHC

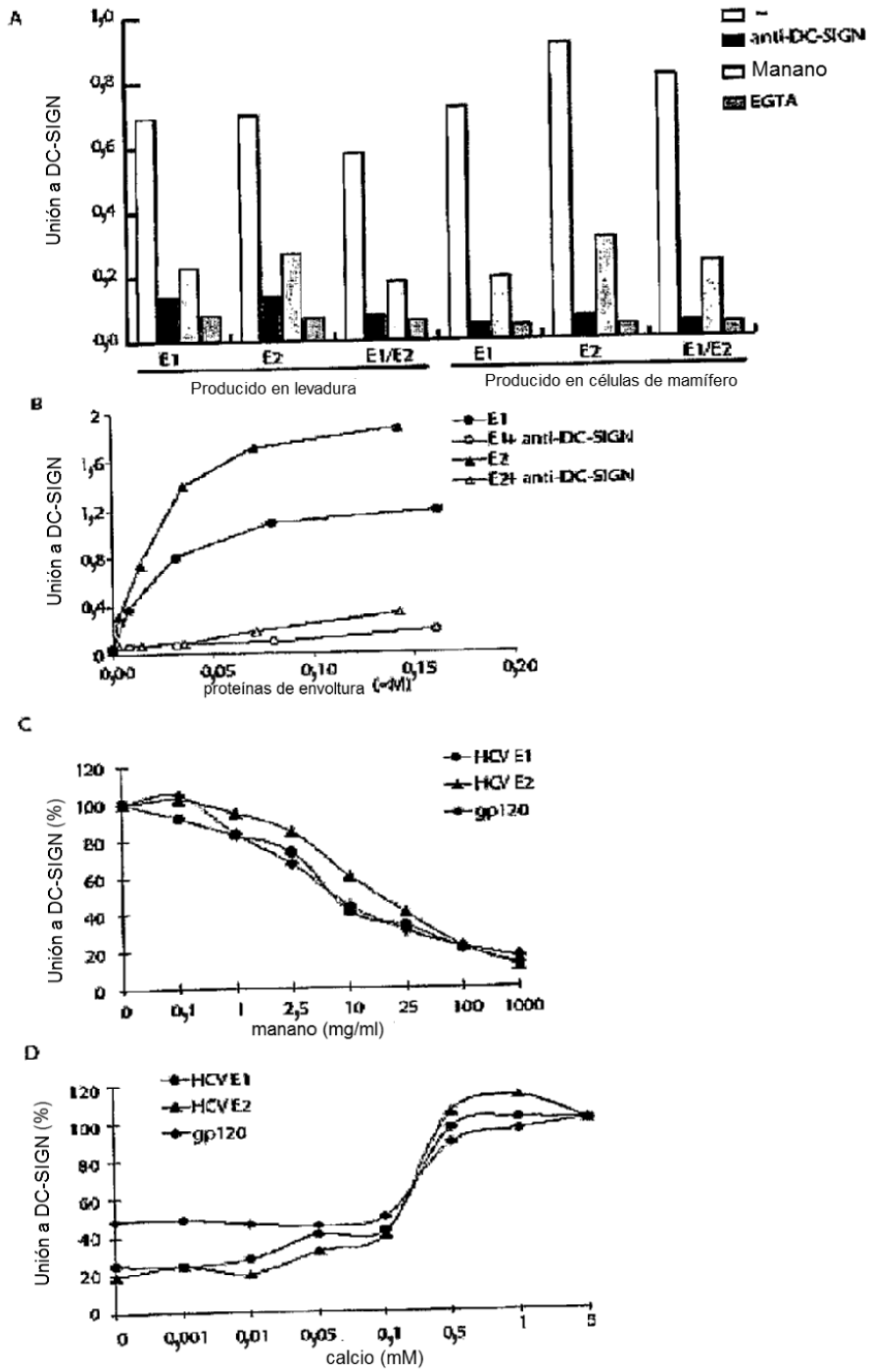


Fig. 36

DC-SIGN y L-SIGN celulares se unen a las proteínas E1 y E2 del VHC

DC-SIGN tiene un sitio de unión similar para gp120 y VHC

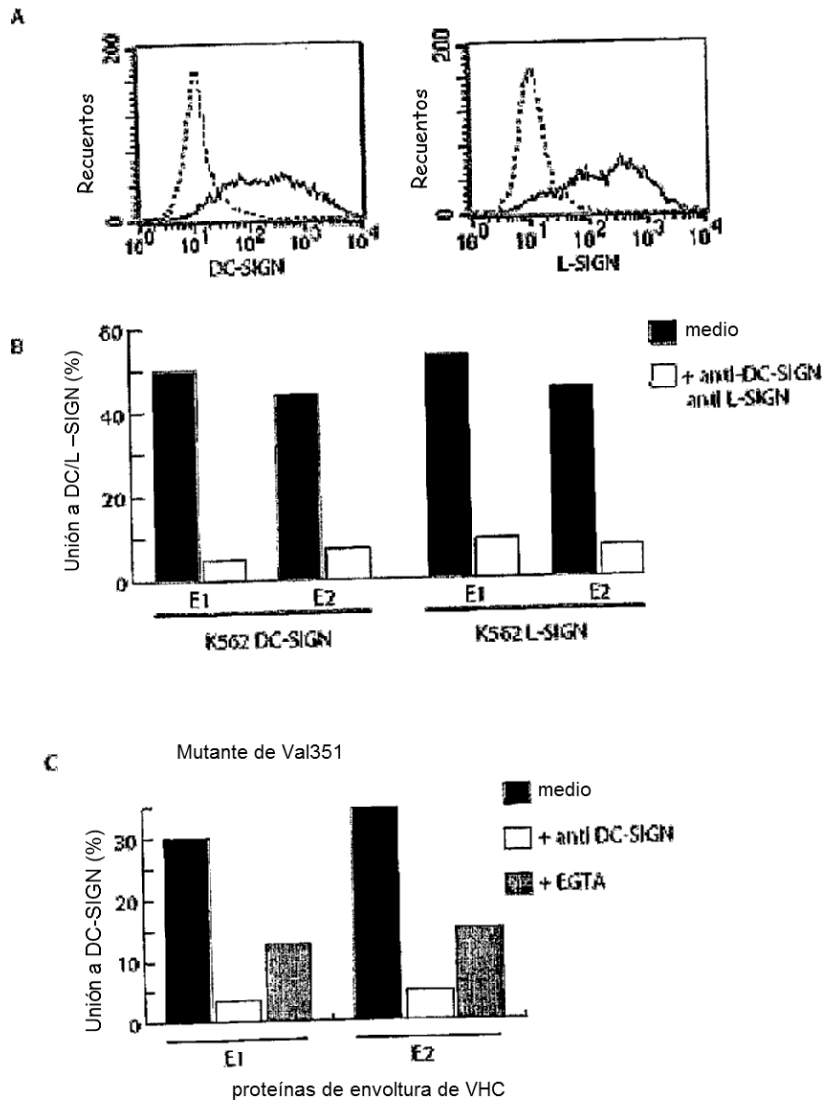


Fig. 36D

**Restos de aminoácidos esenciales en la unión de DC-SIGN
a sus ligandos gp120 y proteínas de envoltura de VHC**

mutante de DC-SIGN	Adhesión			
	gp120	HCV E1	HCV E2	HCV E1/E2
Tipo Silvestre	% 45	% 50	% 45	% 50
E347Q	4	3	7	7
N349D	0	5	9	7
N365D	0	5	9	9
D366A	3	4	5	6
D320A	7	4	6	5
E324A	0	4	7	6
N350A	1	4	8	5
D355A	2	4	8	7

Transfectantes de K562 estables

Fig. 37

VHC se internaliza mediante DC-SIGN y L-SIGN;
la ruta de internalización depende de la línea celular

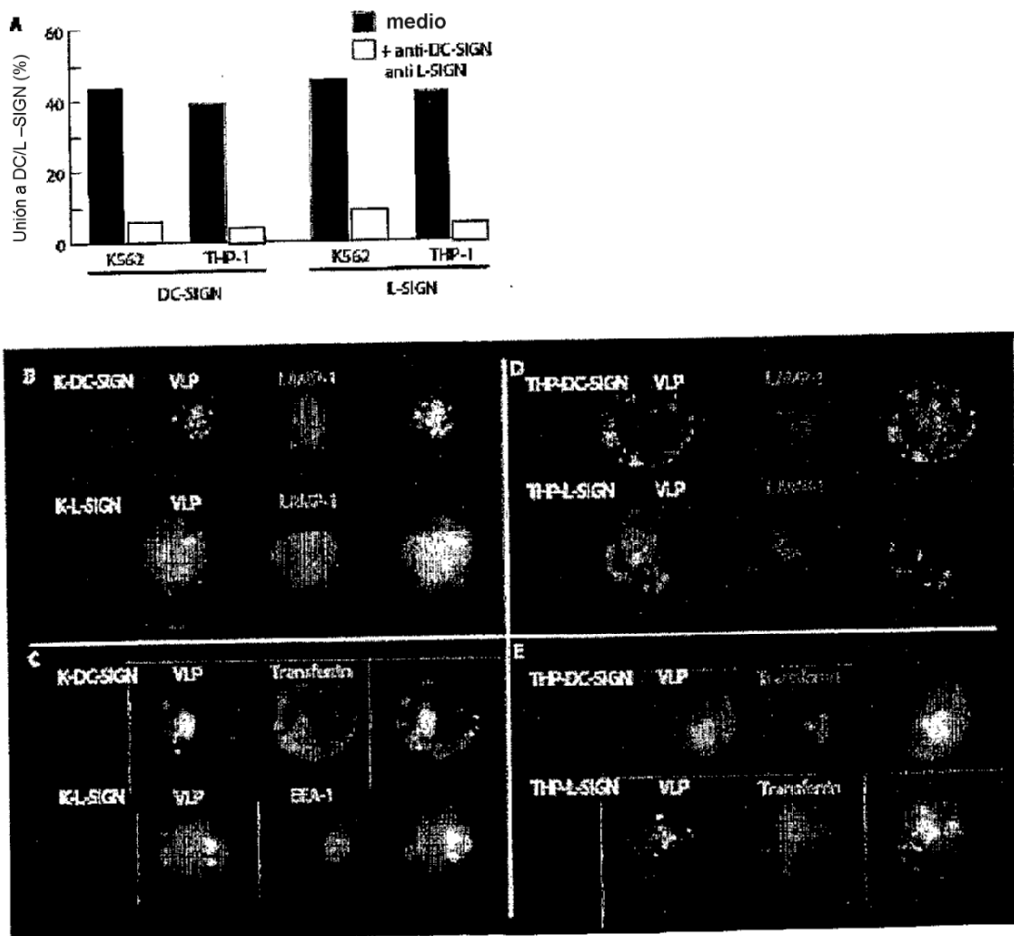


Fig. 38

DC inmaduras y maduras se unen a VHC a través de DC-SIGN

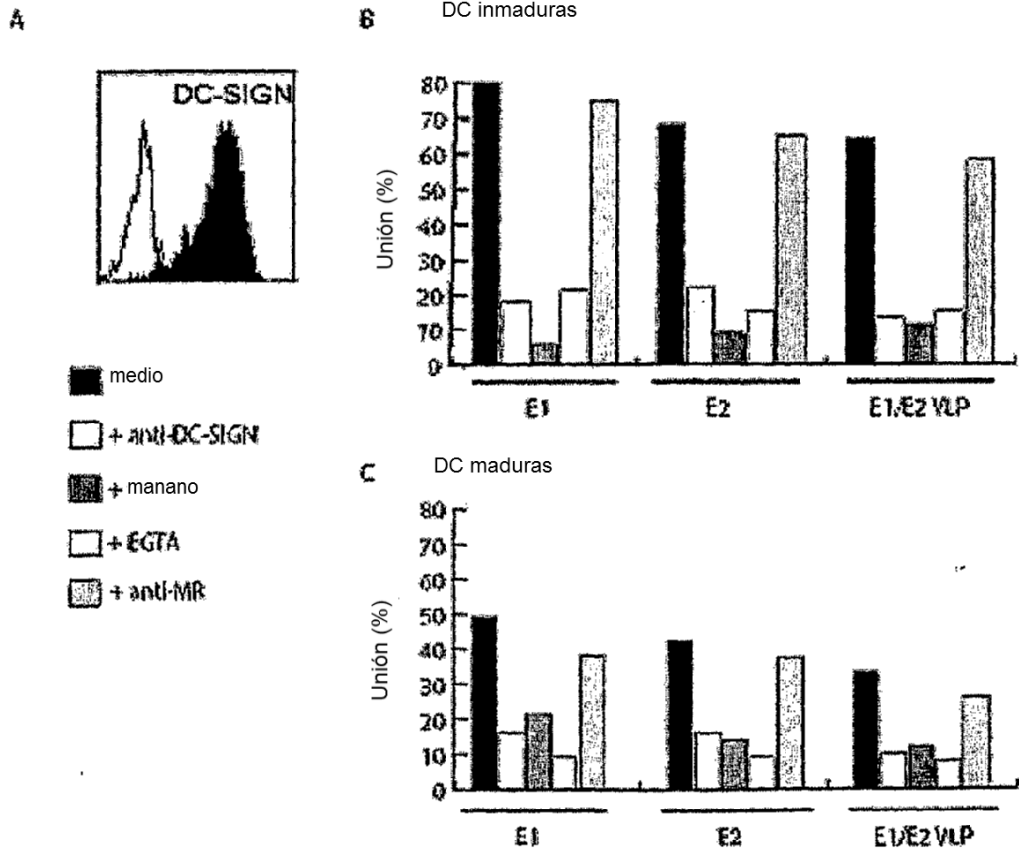


Fig. 39

Las DC inmaduras capturan e internalizan VHC a través de DC-SIGN;
VHC se dirige a los endosomas tempranos

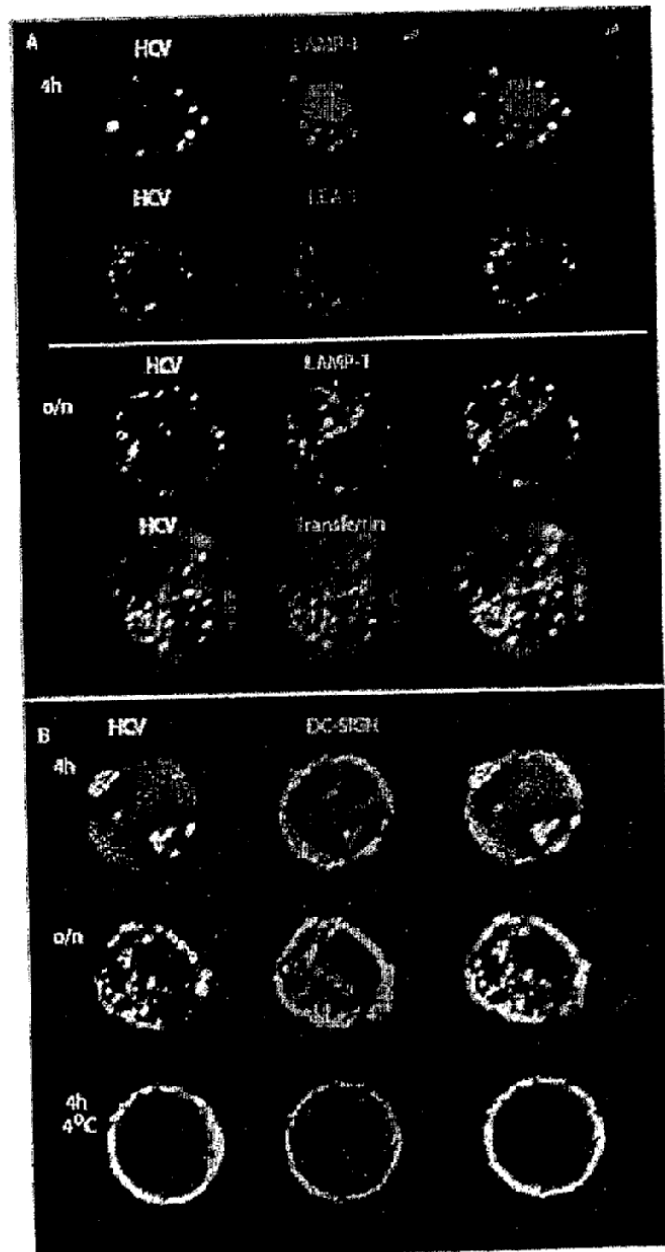


Fig. 40

Las DC inmaduras internalizan carbohidratos
a través de DC-SIGN

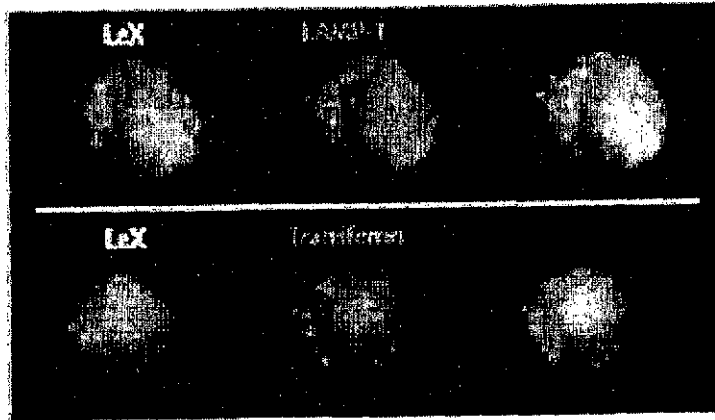


Fig. 41

Unión de VHC a secciones de hígado

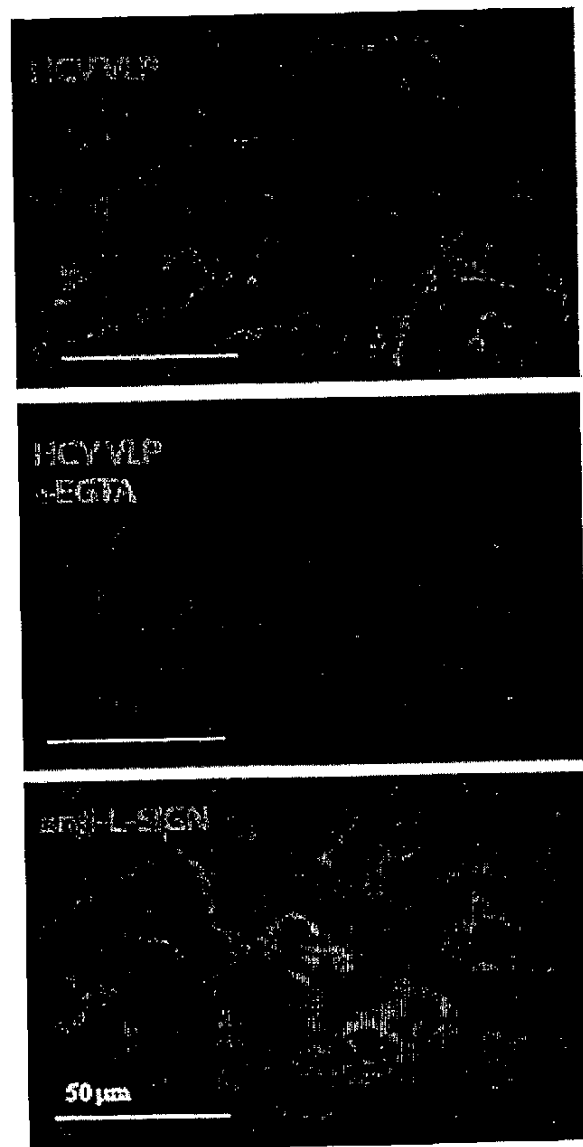


Fig. 42

Antígenos de grupo sanguíneo de Lewis y algunas de sus subestructuras se unen a DC-SIGN.

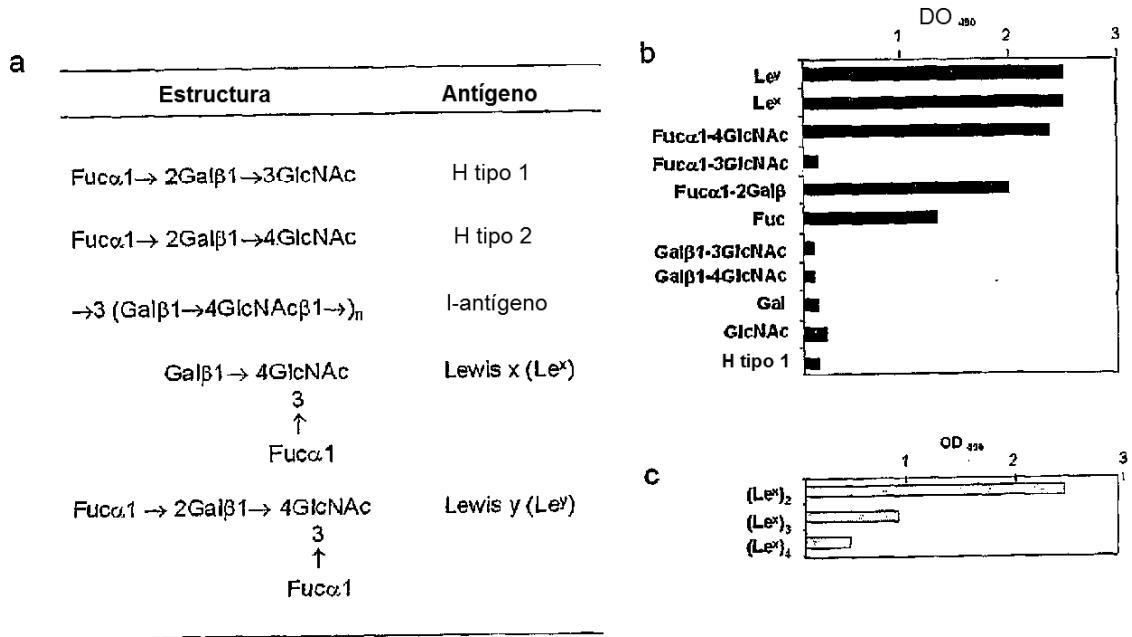


Fig. 43

La unión de *H. pylori* depende de la expresión del antígeno de Lewis

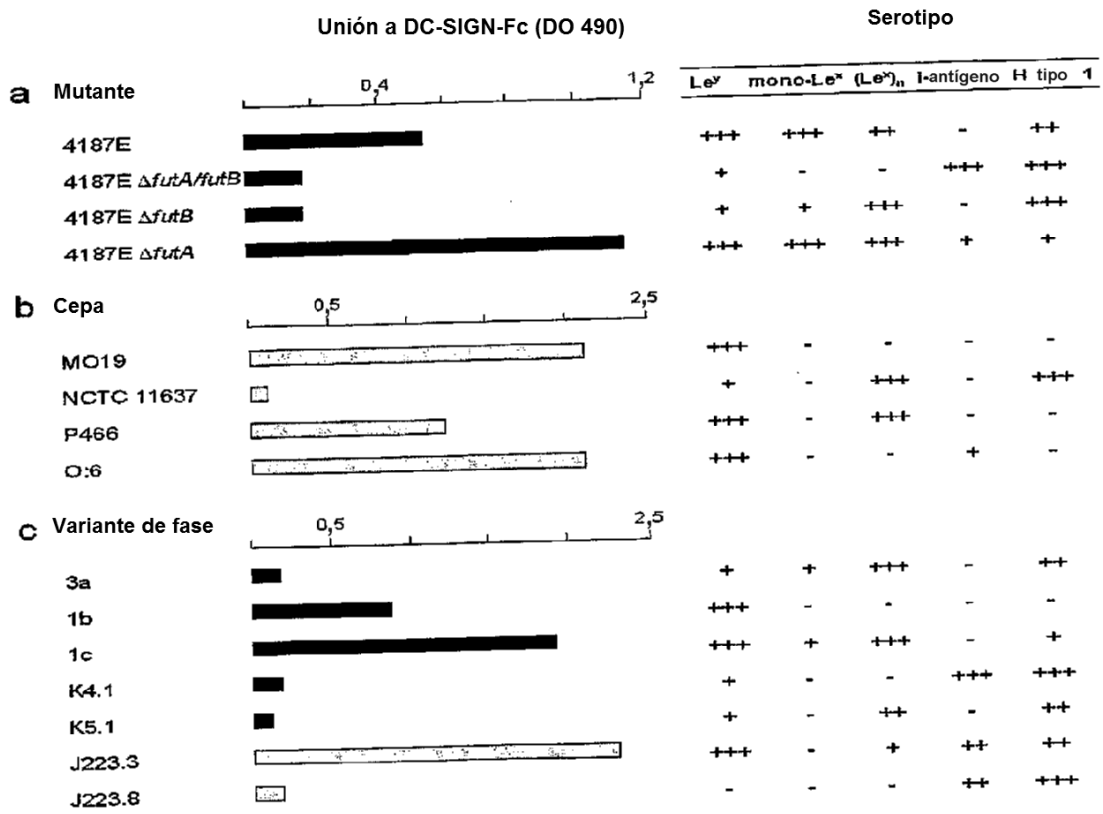


Fig. 44

La variación de fase de LPS en *H. pylori* se produce *in vivo*.

a

Cepa	Número de colonias (%)	Serotipo				
		Le ^r	mono-Le ^r	(Le ^x) _n	i-antígeno	H tipo 1
J223.3	6/30 (20)	+++	-	++	++	+++
J223.8	24/30 (80)	-	-	-	+++	+++

b

Cepa	Longitud del tracto C en el gen			Serotipo			
	<i>futA</i>	<i>futB</i>	Le ^r	mono-Le ^r	(Le ^x) _n	i-antígeno	H tipo 1
J223.3	n=9 ("desactivado")	n=10 ("activado")	+++	-	++	++	+++
J223.8	n=9 ("desactivado")	n=9 ("desactivado")	-	-	-	+++	+++
J223.3 Δ <i>futB</i>	N.D.	N.D.	-	-	-	+++	+++

c

J223.3		<i>futA</i>	J223.3		<i>futB</i>
1	ATGTTCCAAC	CCCTATTAGA	CGCCTTCATA	1	ATGTTCCAAC
	GAAAGCGCTT	CCATTGAAA	AATGGCCTCT		GAAAGCGCTT
61	AAATCTCCC	CCCCCTAA (PARADA)		61	AAATCTCCC
					CCCCCTAAA AATC etc.
J223.8		<i>futA</i>	J223.8		<i>futB</i>
1	ATGTTCCAAC	CCCTATTAGA	CGCCTTCATA	1	ATGTTCCAAC
	GAAAGCGCTT	CCATTGAAA	AATGGCCTCT		GAAAGCGCTT
61	AAATCTCCC	CCCCCTAA (PARADA)		61	AAATCTCCC
					CCCCCTAA (PARADA)

Fig. 45

DC-SIGN se expresa en las DC gástricas y es el receptor principal para *H. pylori* positivo para Le

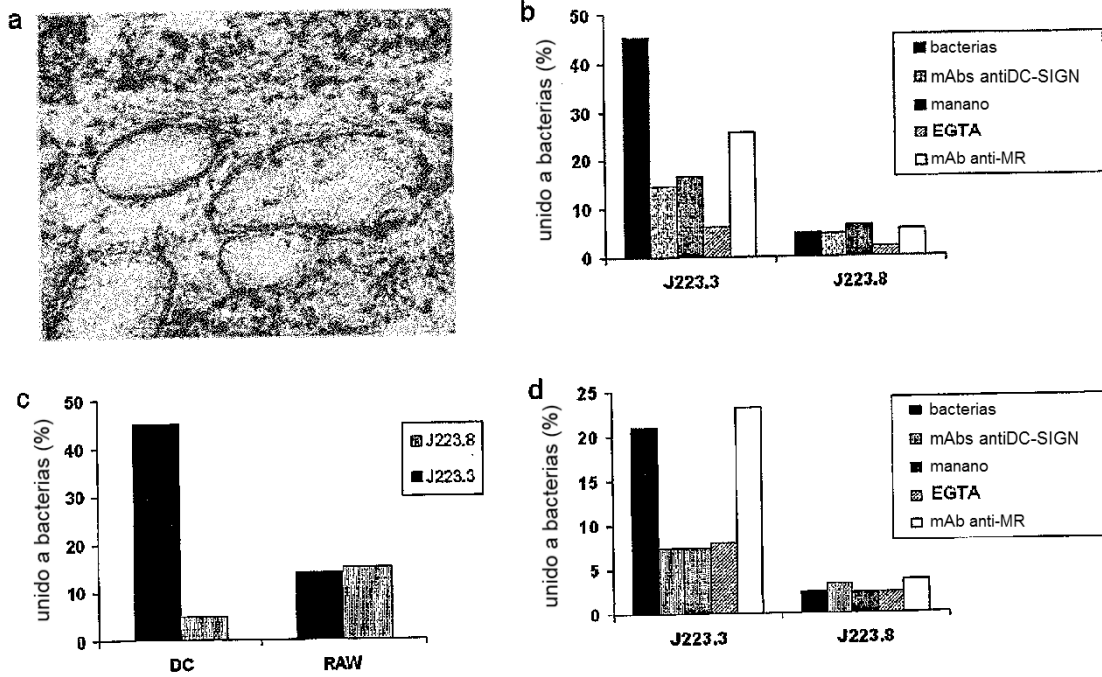


Fig. 46

La unión de *H. pylori* a induce un aumento de la producción de IL-10 y IL-12 dependiente de DC-SIGN, pero no cambia en IL12p70

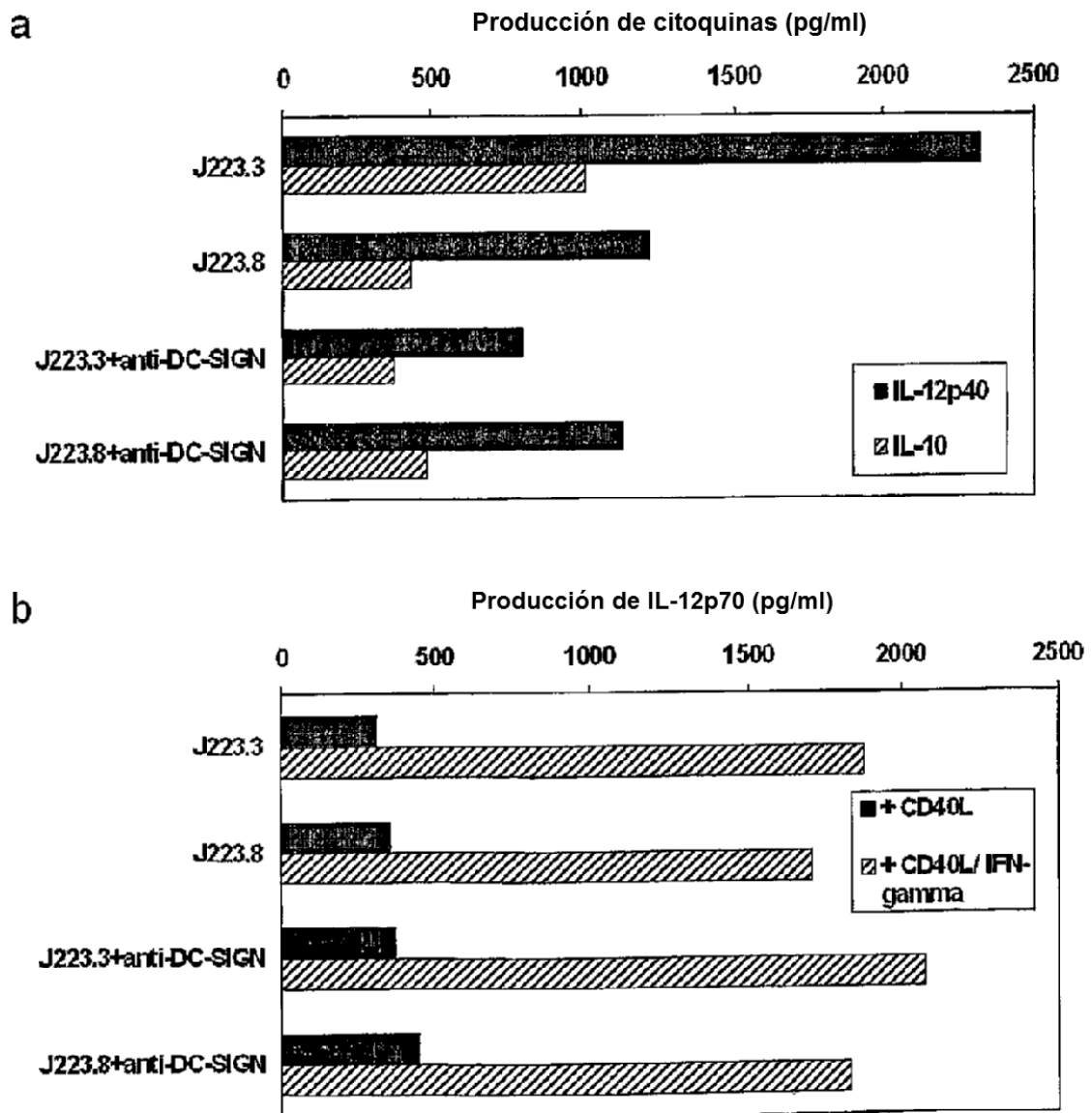
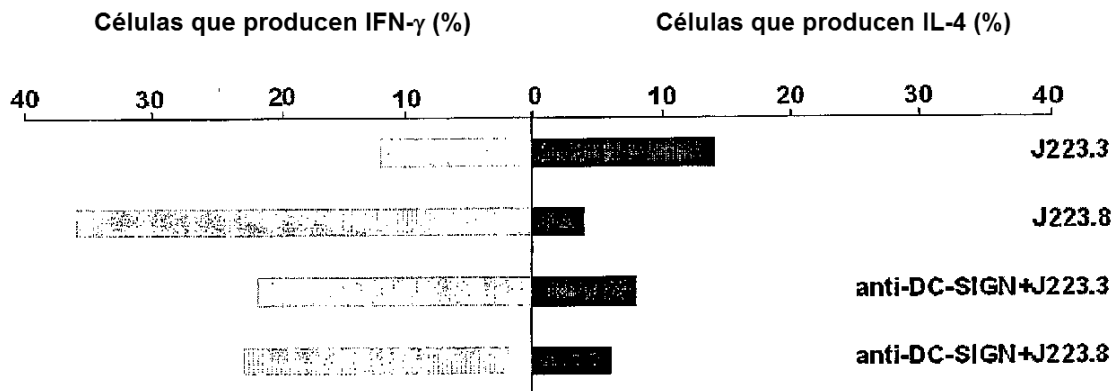


Fig. 47

La unión de *H. pylori* a DC-SIGN induce el sesgo de los linfocitos T sin tratamiento previo a Th2.



Los Lactobacilos inducen maduración parcial de DC

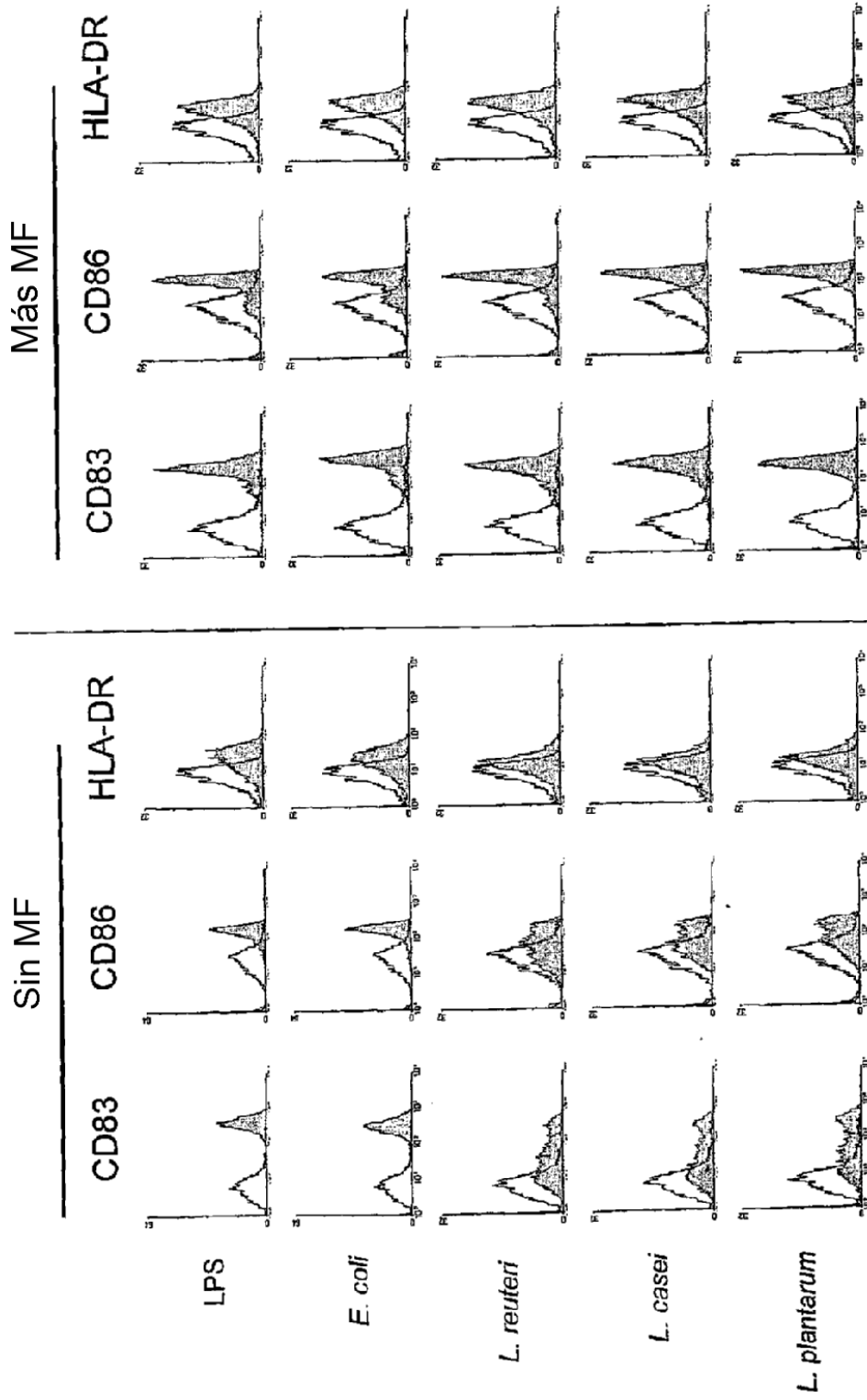


Fig. 48A

Perfiles de citoquinas inducidos en DC por lactobacilos

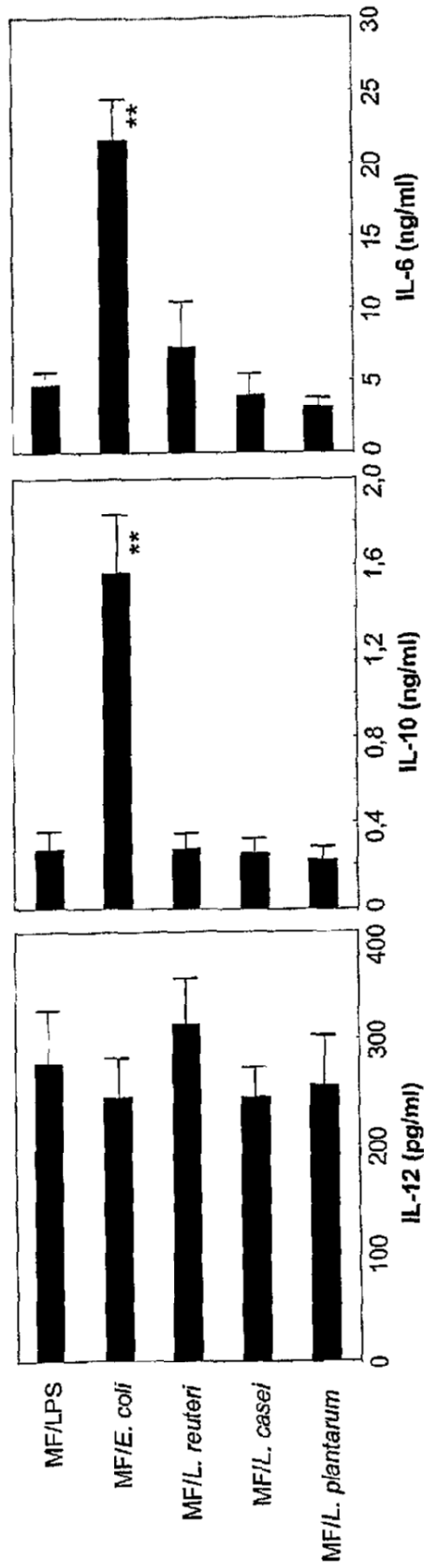


Fig. 48B

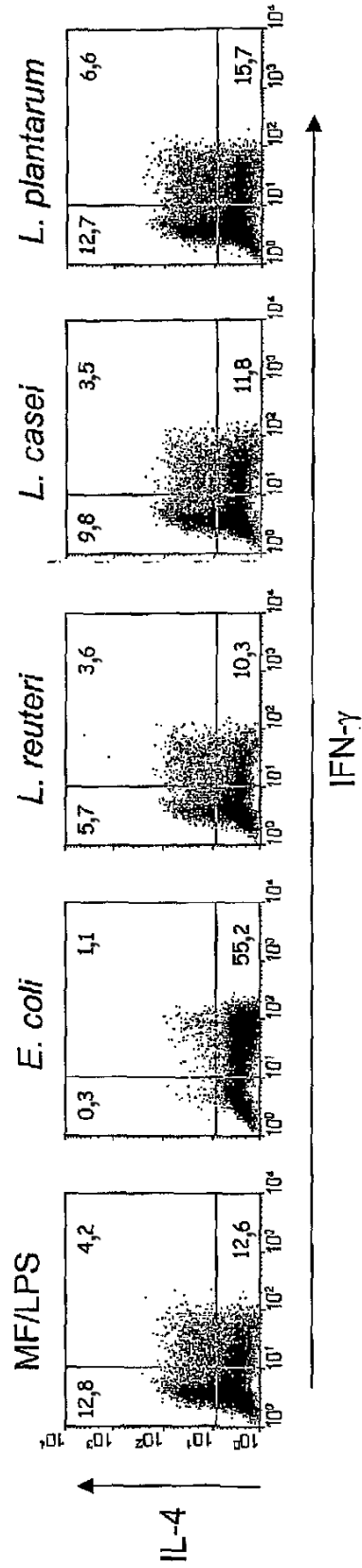


Fig. 49A

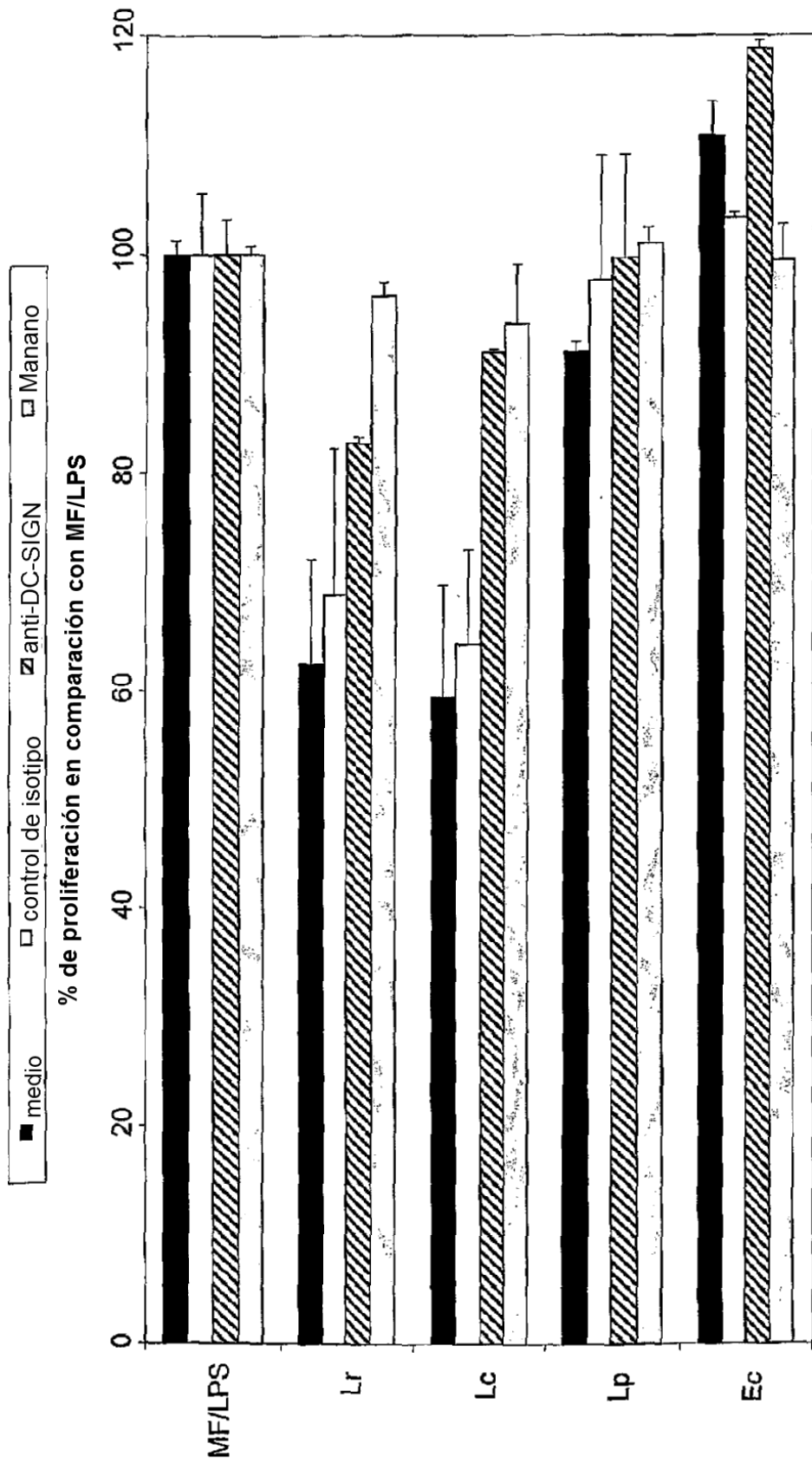


Fig. 49B

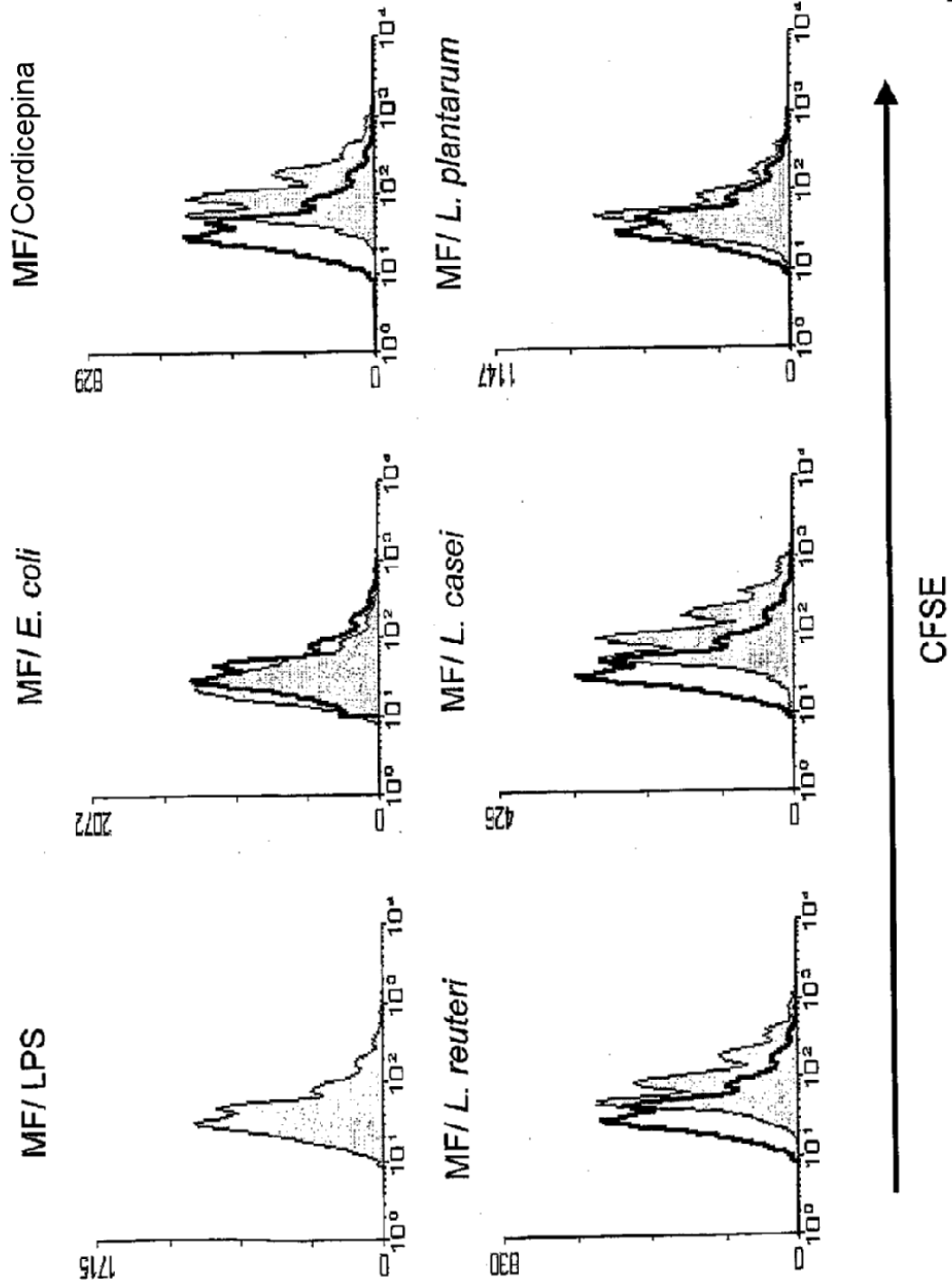


Fig. 49C

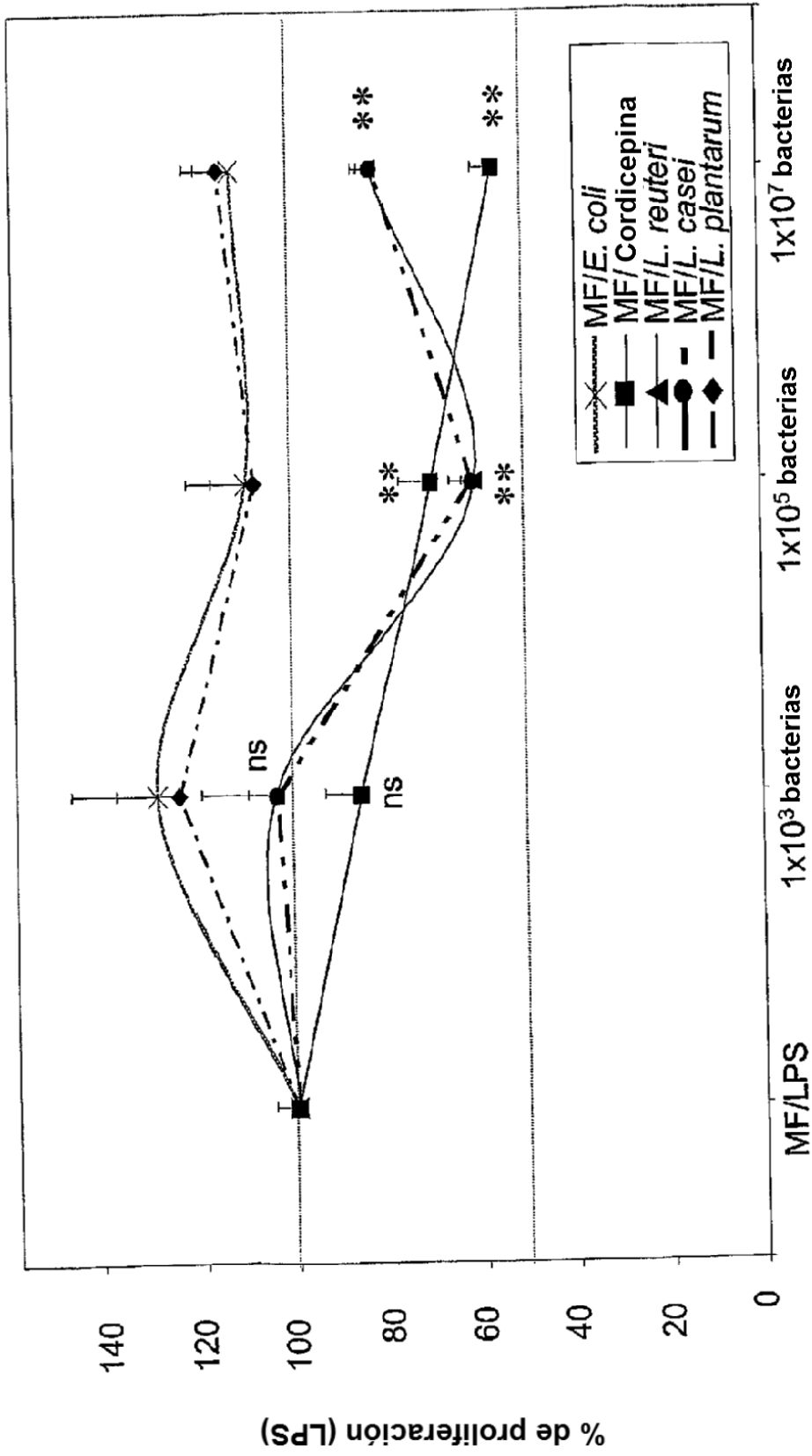


Fig. 49D

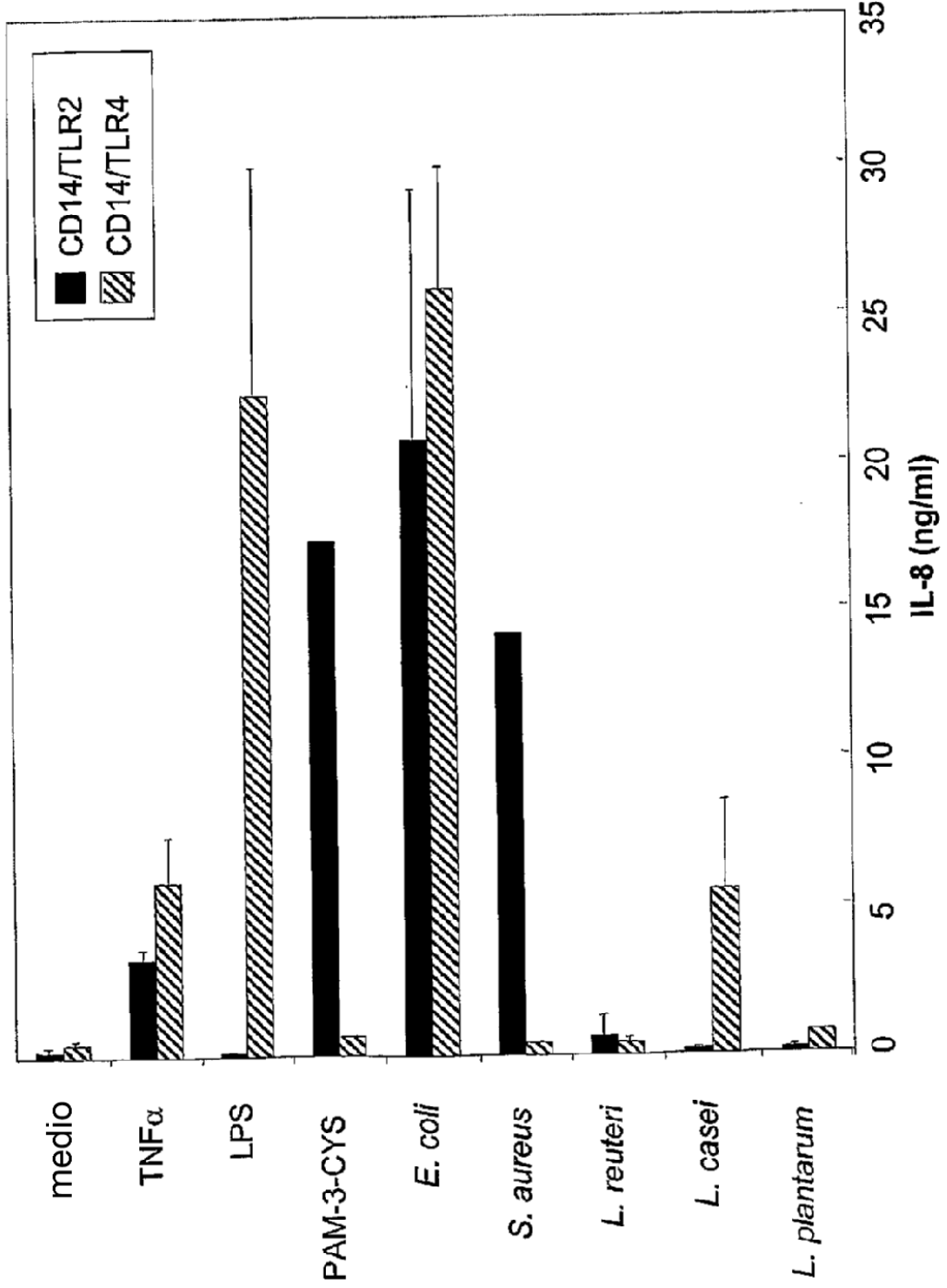


Fig. 50A

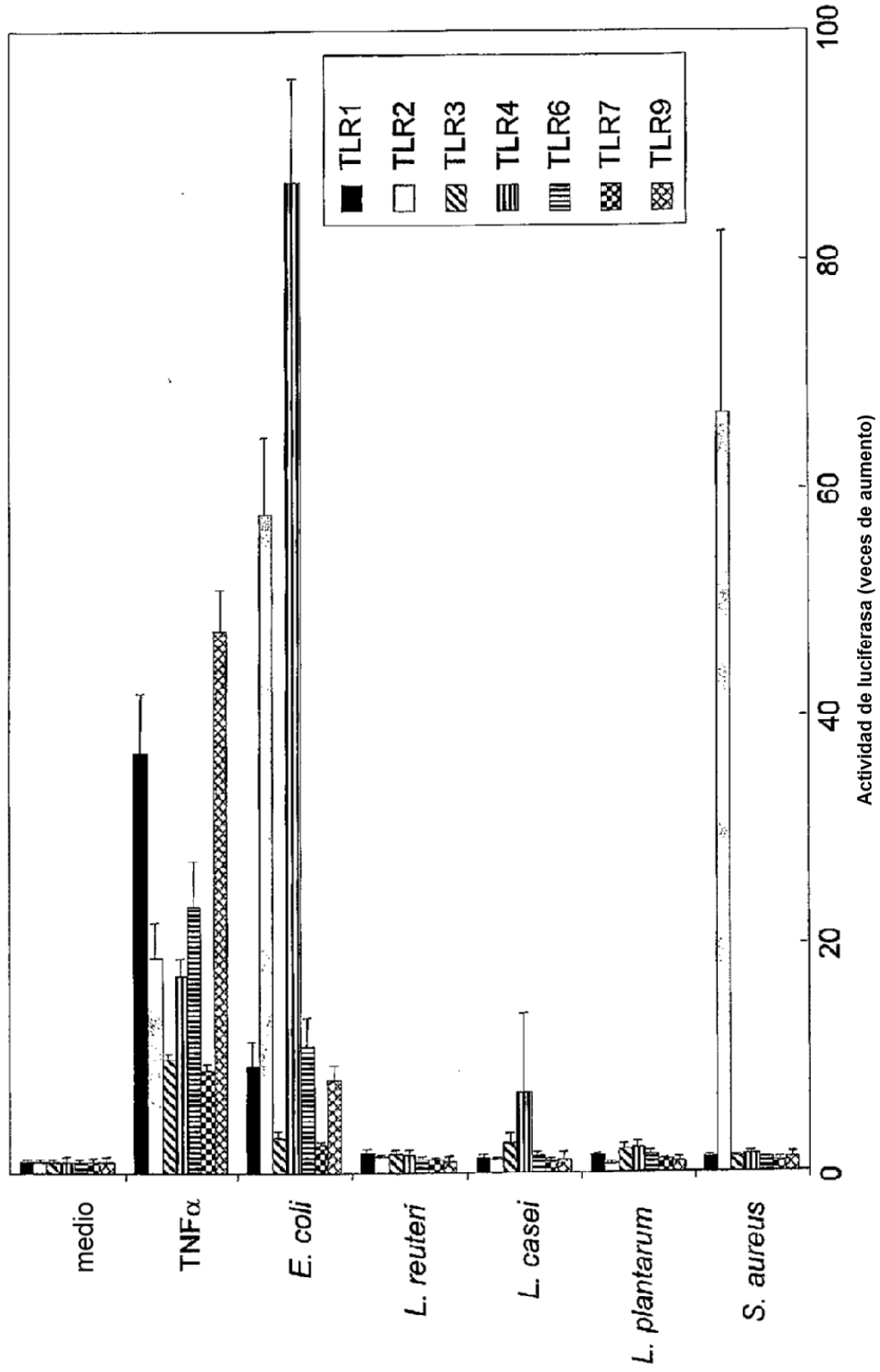


Fig. 50B

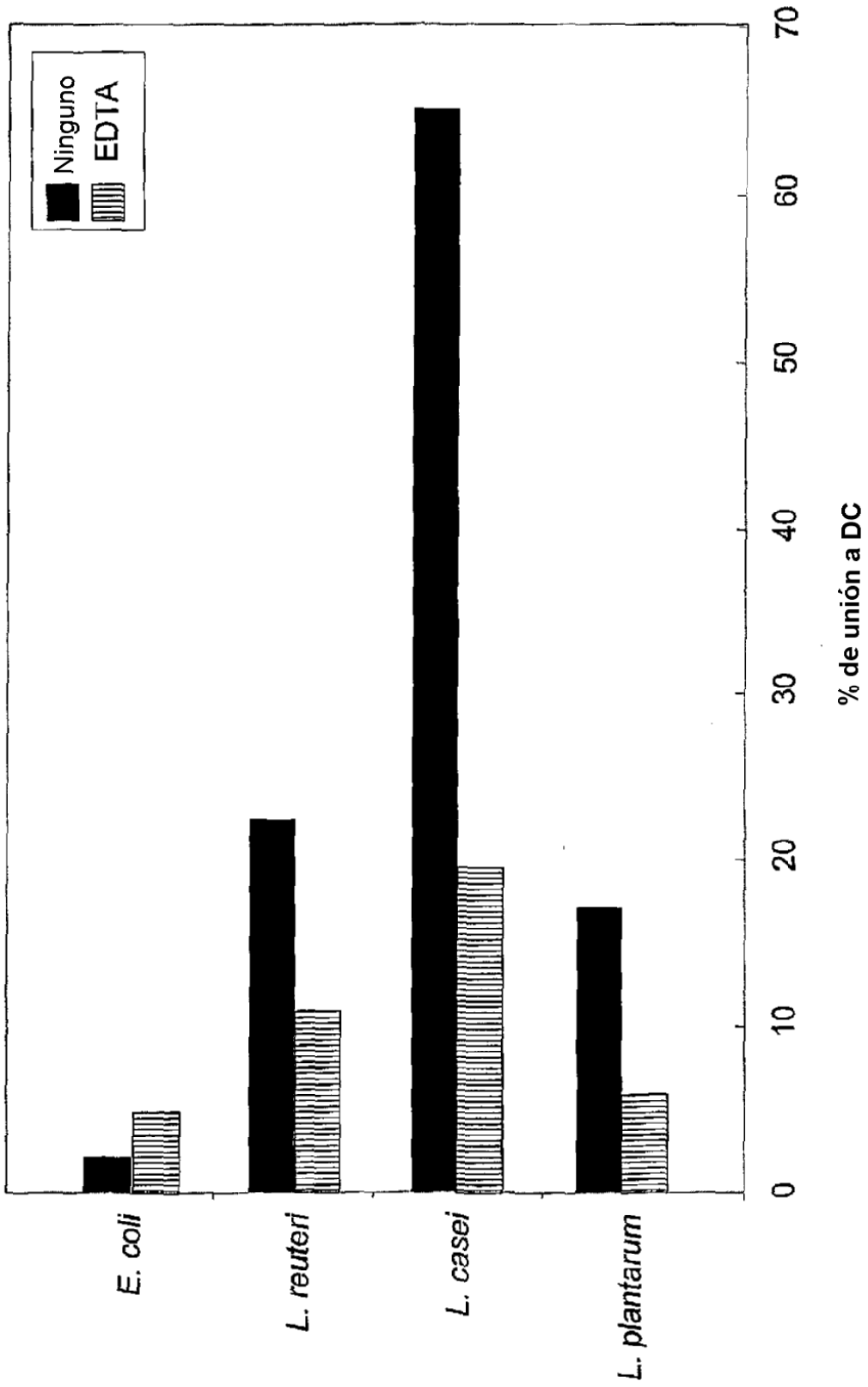


Fig. 51A

Unión de bacterias probióticas a transfectantes de DC-SIGN

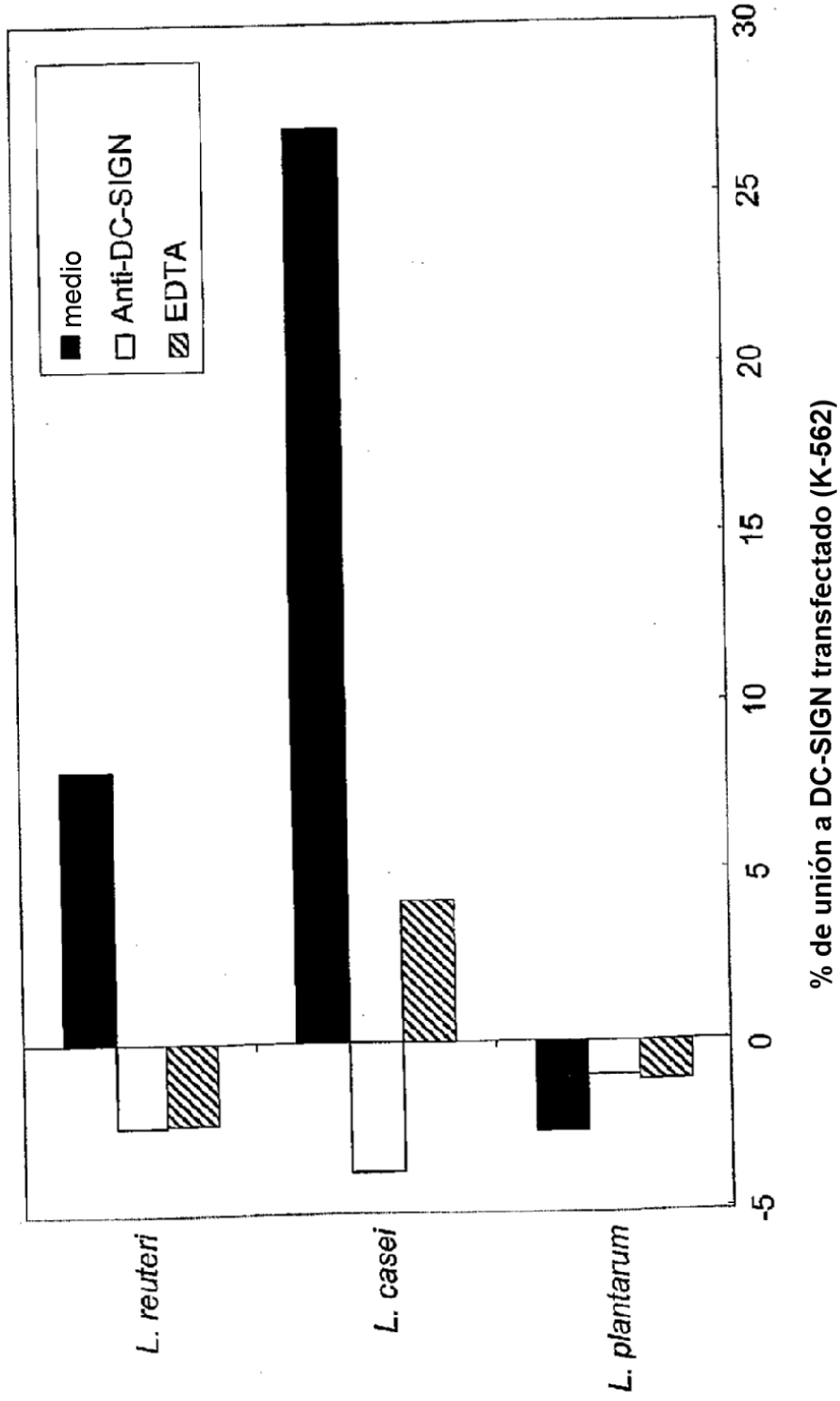


Fig. 51B

Unión de bacterias probióticas a células dendríticas

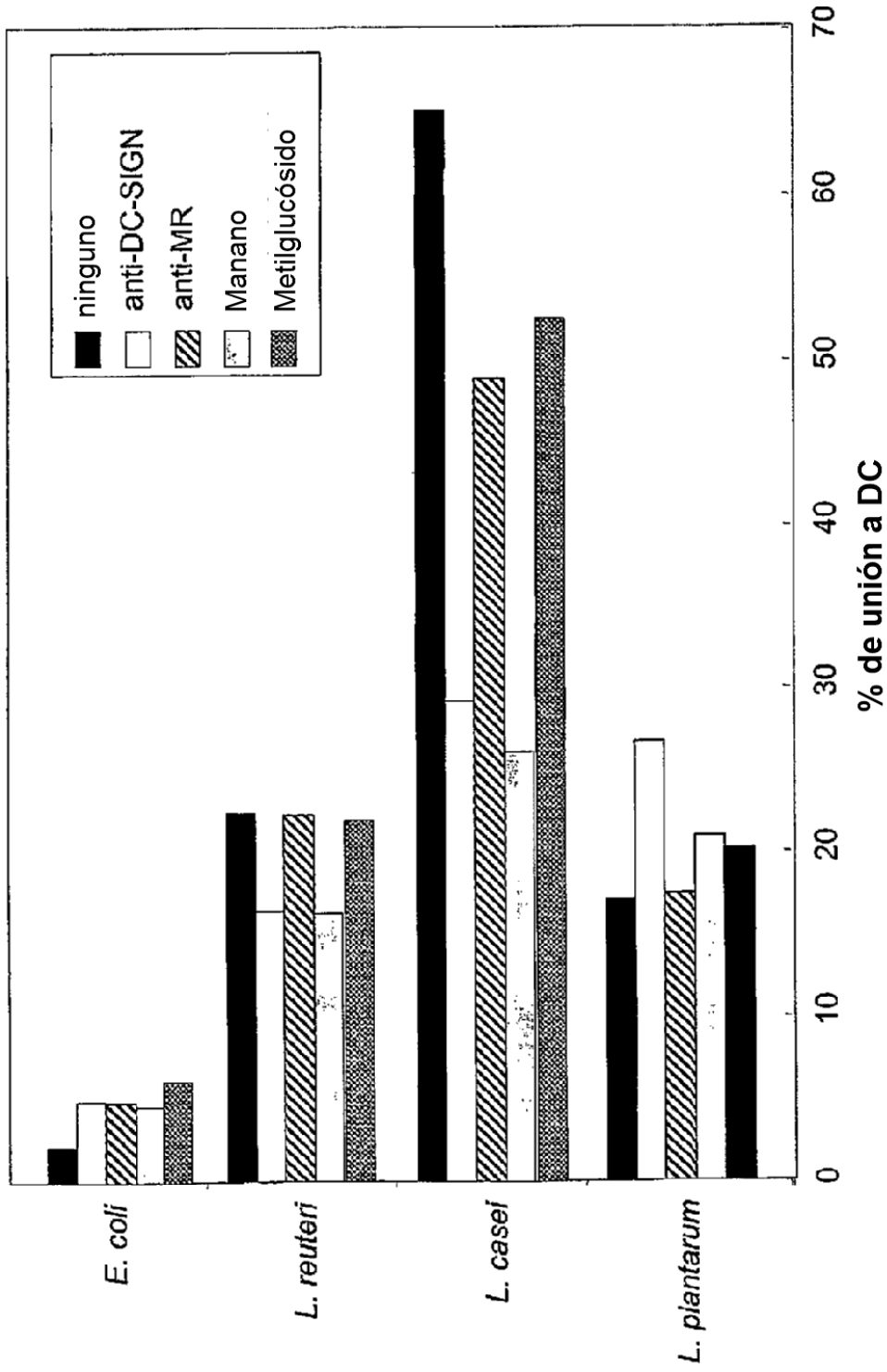


Fig. 51C

Inducción de linfocitos reg T a través de dirección de DC-SIGN mediante bacterias probióticas

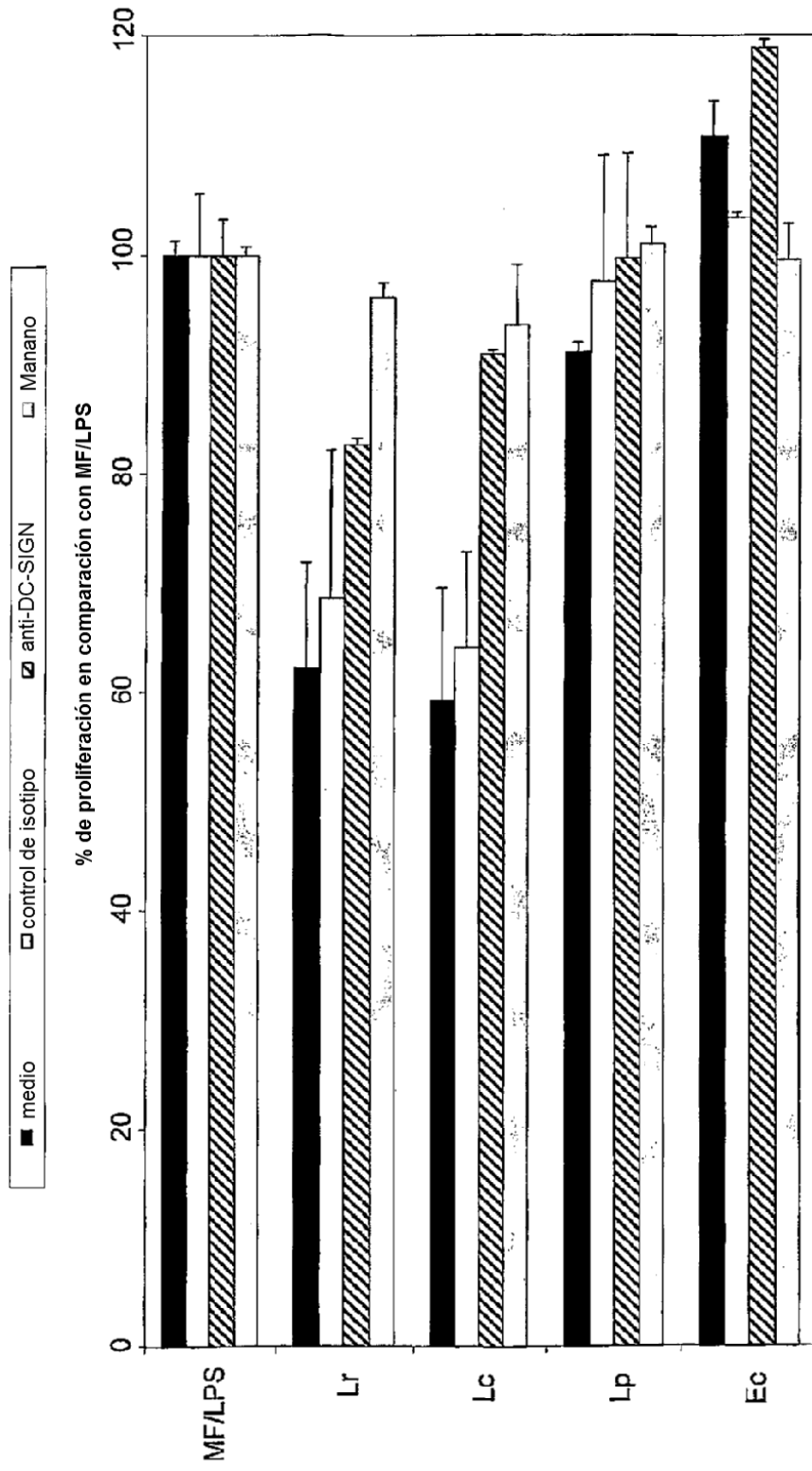


Fig. 52

Fig. 53

PMN expresa el ligando Lewis^x de DC-SIGN
y se une con alta afinidad a DC-SIGN recombinante

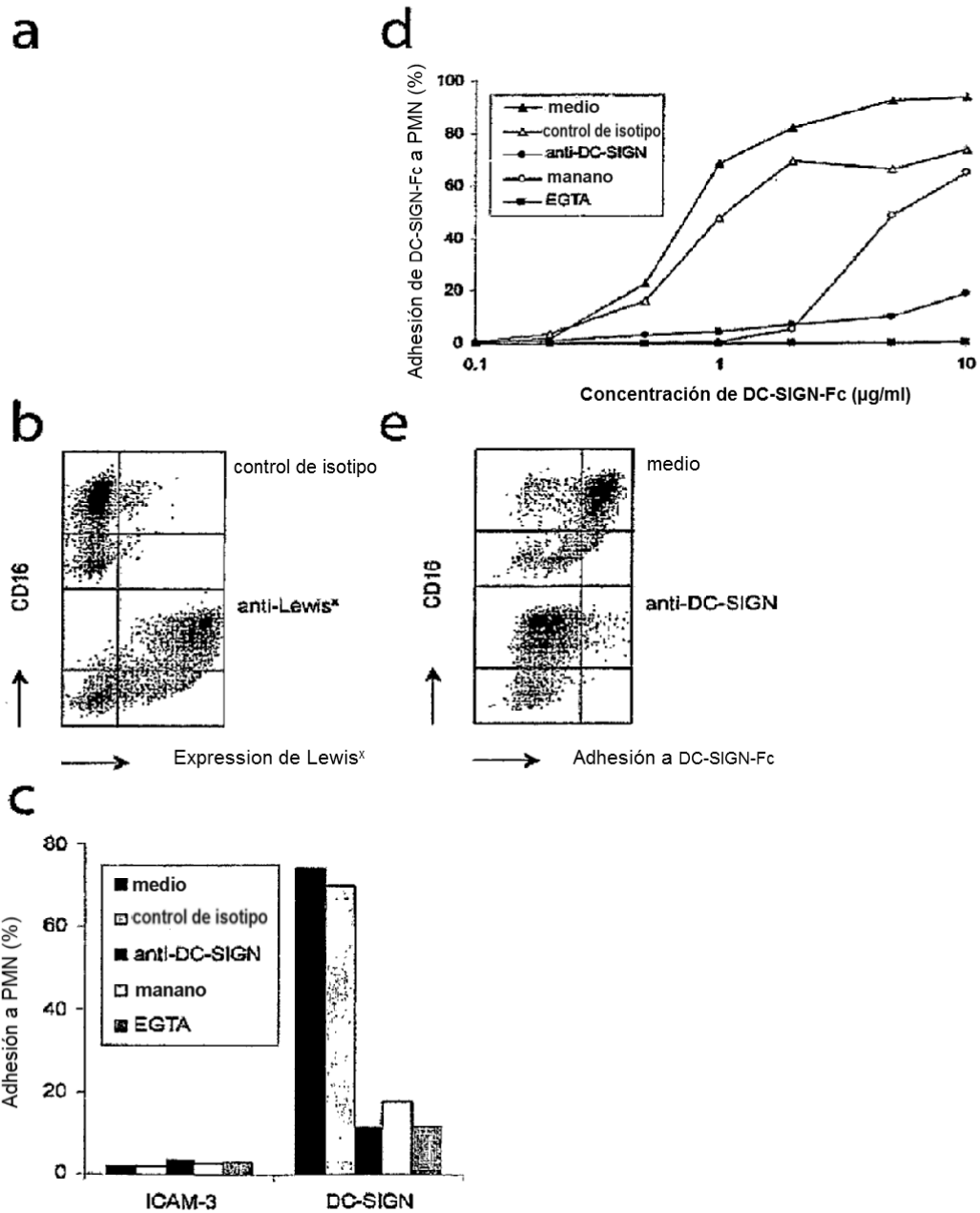


Fig. 54

CEACAM1 expresado en PMN es un ligando de DC-SIGN y se unió a través de sus restos de Lewis^x.

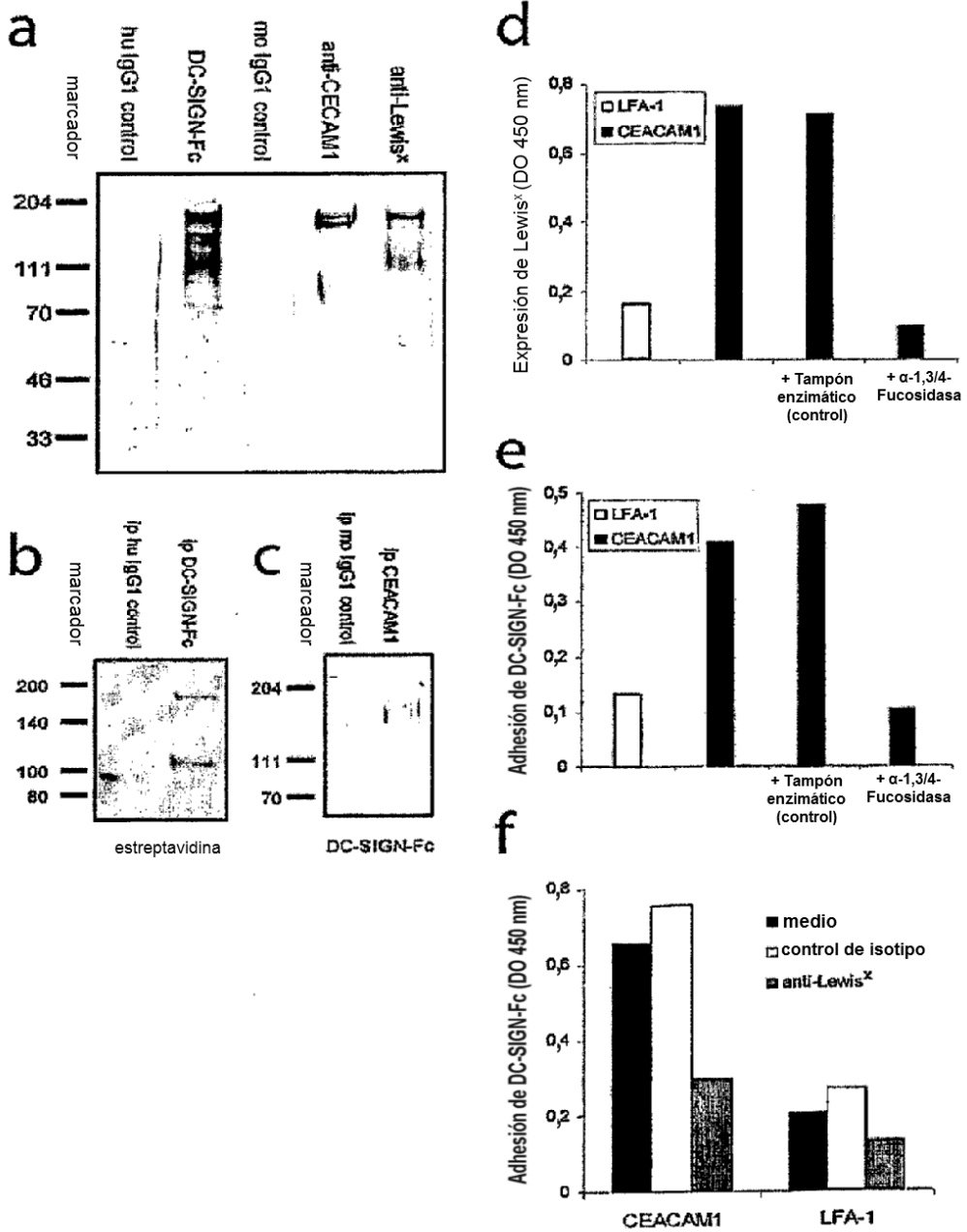


Fig. 55

DC-SIGN celular expresado en transfectantes de K562 y la DC inmadura se une a CEACAM1 nativo a partir de PMN

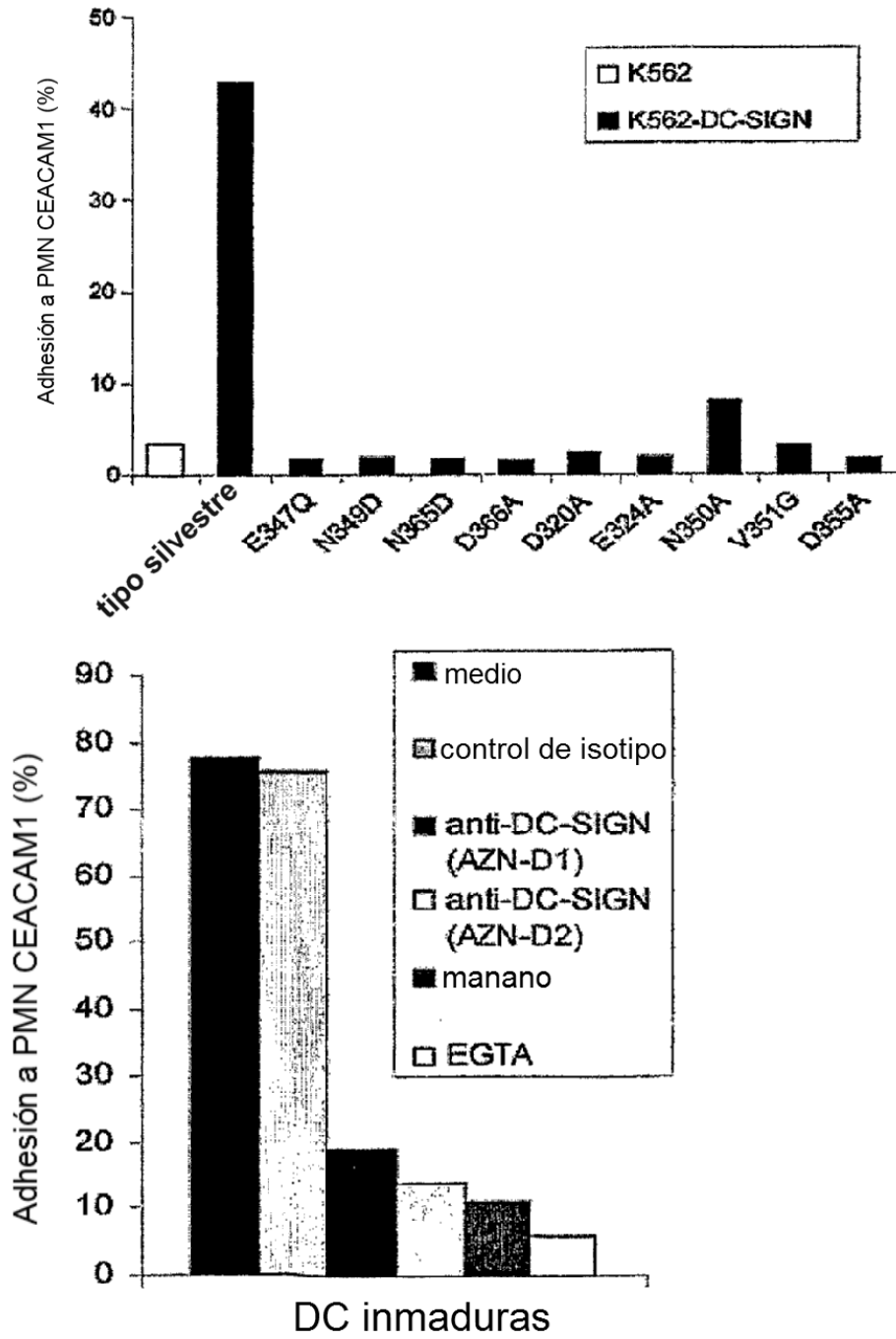


Fig. 56

DC-SIGN está implicada en el agrupamiento de DC y PMN.

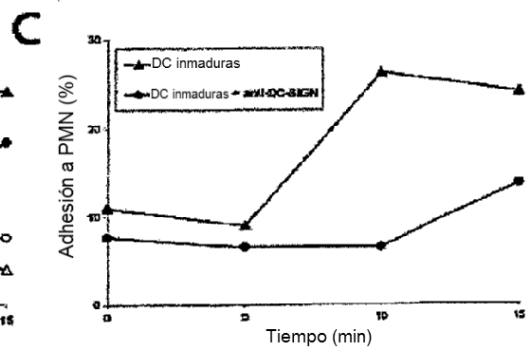
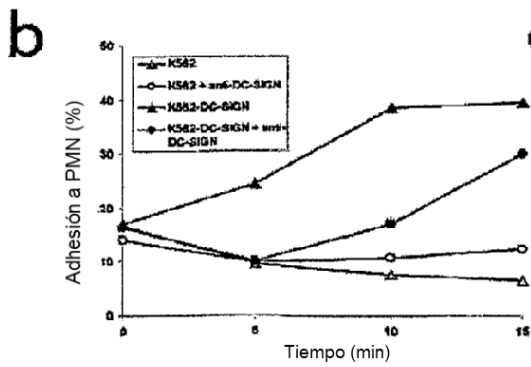
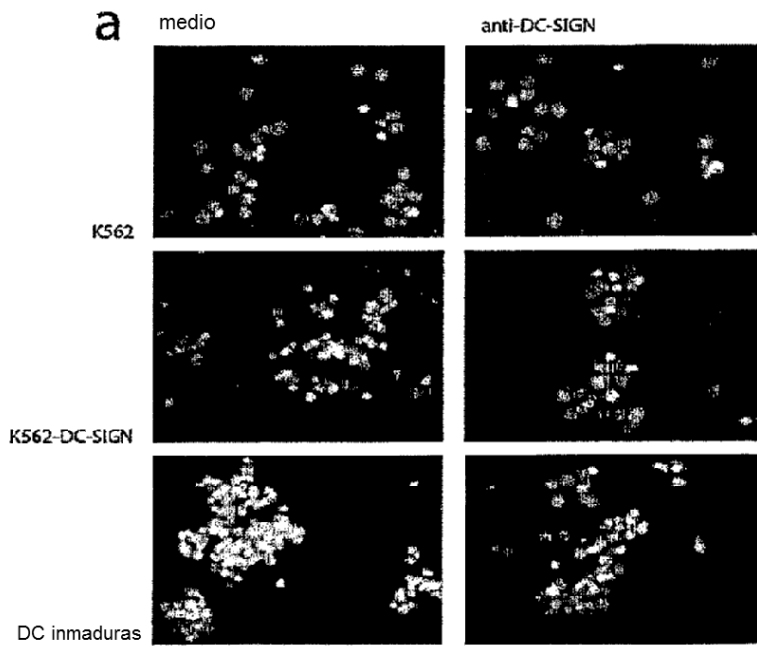


Fig. 57

Localización de PMN y DC en la mucosa colónica de pacientes con enfermedad de Crohn.

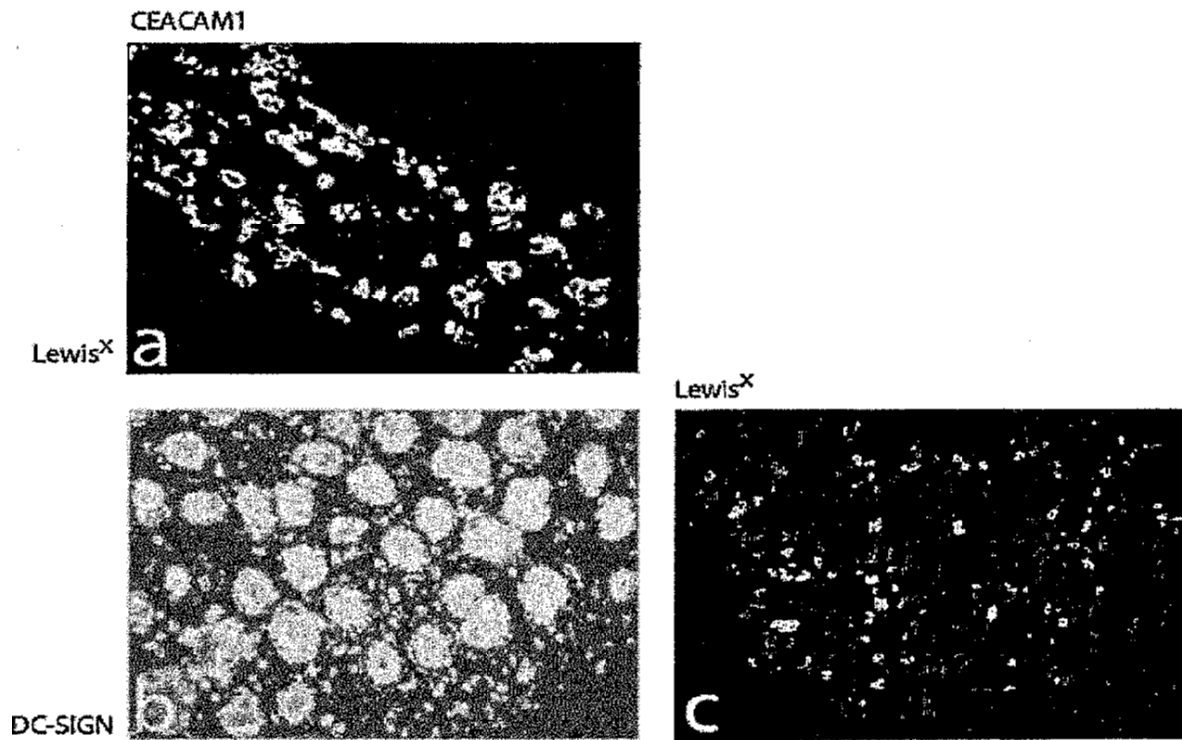
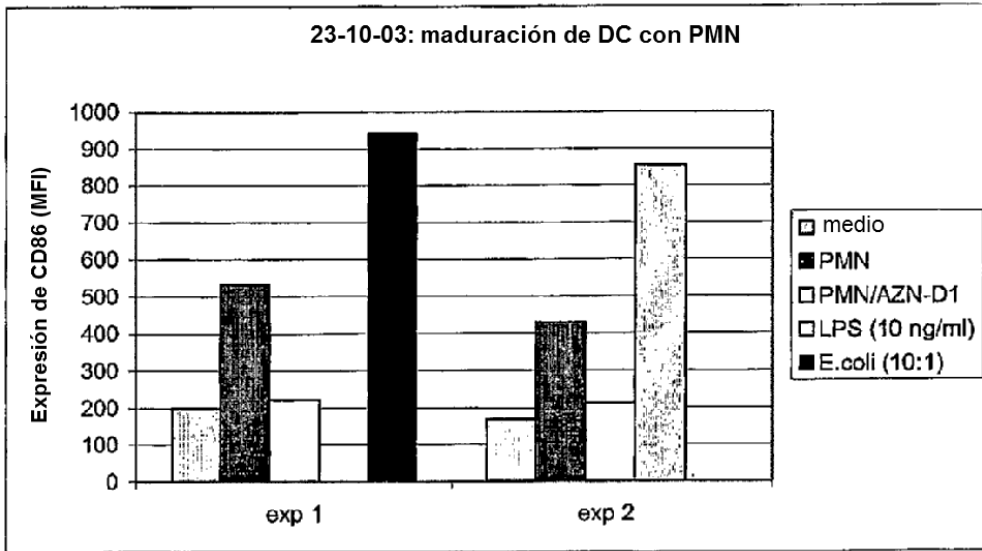


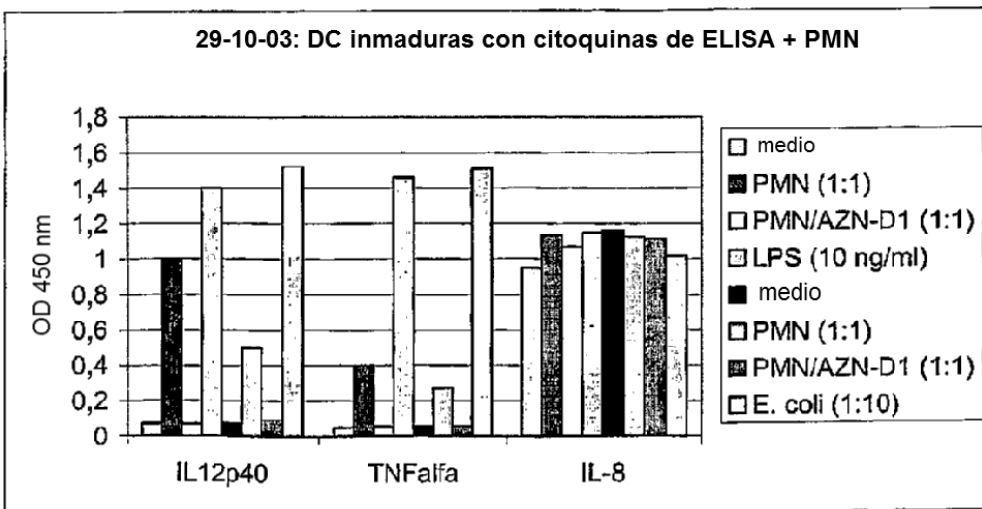
Fig. 58

Localización de PMN y DC en la mucosa colónica de pacientes con enfermedad de Crohn.



A

PMN induce la regulación positiva de CD86 coestimulador en DC, que depende de la unión a DC-SIGN



B

PMN induce la secreción de citoquinas inflamatorias por DC, que depende de la unión a DC-SIGN

Fig. 59

DC-SIGN se une a Lex que expresa CD11b presente en neutrófilos

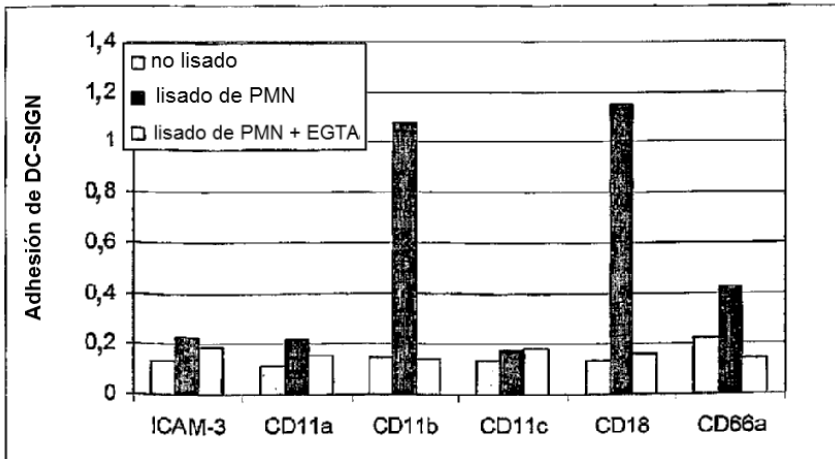
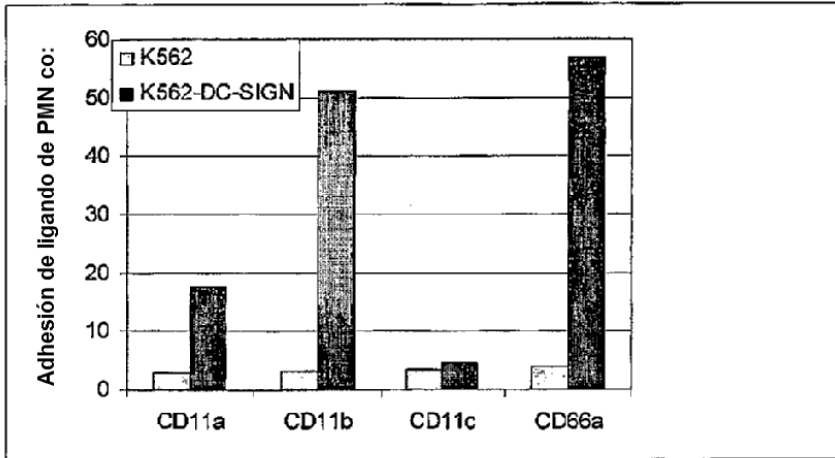
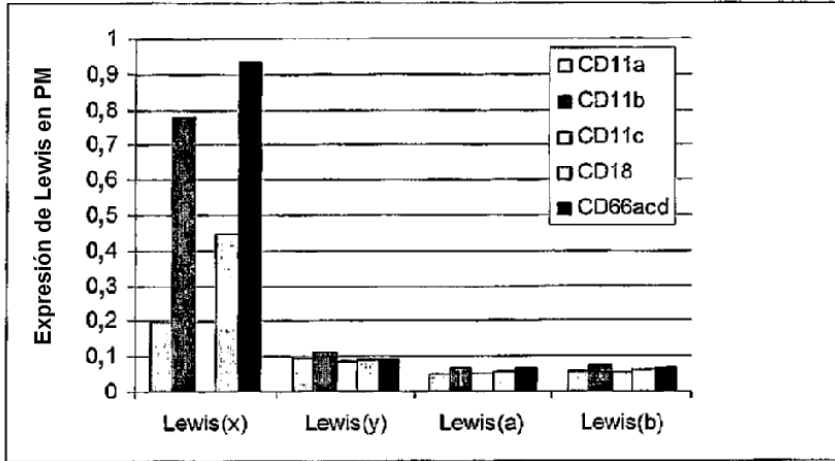
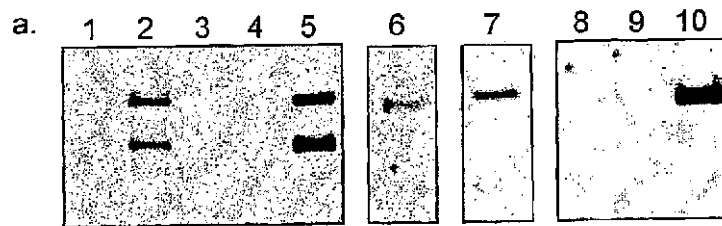


Fig. 59D

DC-SIGN se une a CD66acd y CD11b en PMN



.PMN Biotinilado

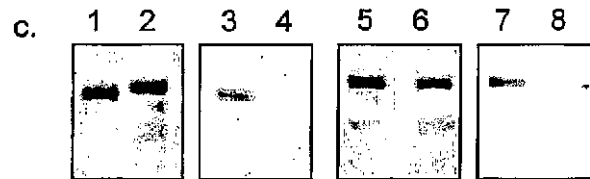
1. IP ICAM-3-Fc, IB, estreptavidina
2. IP DC-SIGN-Fc, IB estreptavidina,
3. IP anti-DC-SIGN, IB estreptavidina,
4. IP anti-CD66acd, IB estreptavidina,
5. IP anti-CD11b, IB estreptavidina,
6. IP DC-SIGN-Fc, IB anti-CD66acd,
7. IP DC-SIGN-Fc, IB anti-CD11b,
- 8 IP anti-DC-SIGN, IB DC-SIGN-Fc,
9. IP anti-CD66acd, IB DC-SIGN-Fc,
10. IP anti-CD11b, IB DC-SIGN-Fc.

IB, inmunotransferencia (detección/unión)

IP, inmunoprecipitación (captura)

Fig. 60

DC-SIGN se une a Lewis en CD11b



PMN Biotinilado, IP anti-CD11b, IB estreptavidina:

1. control
2. PNGase F

SW948 Biotinilado, IP anti-CD11b, IB DC-SIGN-Fc

3. control
4. PNGase F

PMN Biotinilado, IP anti-CD11b, IB estreptavidina:

5. control
6. α -1,3/4-Fucosidasa

PMN Biotinilado, IP anti-CD11b, IB DC-SIGN-Fc

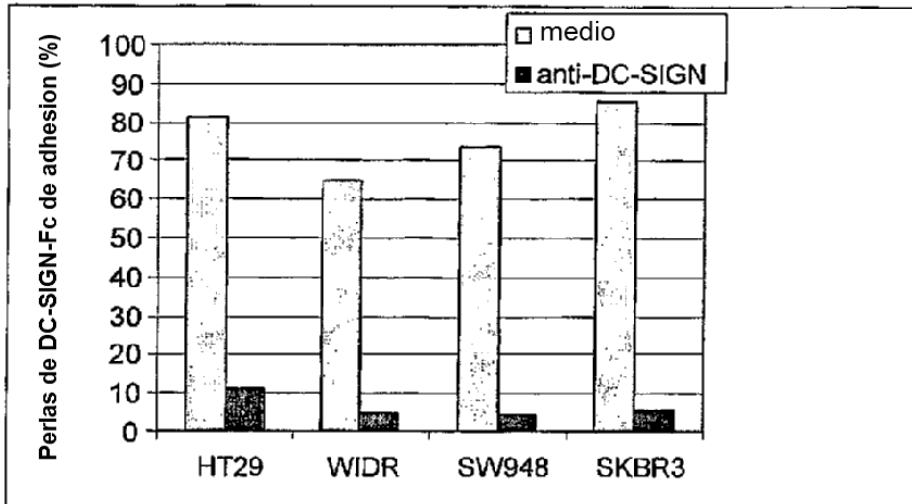
7. control
8. α -1,3/4-Fucosidasa

IB, inmunotransferencia (detección/unión)

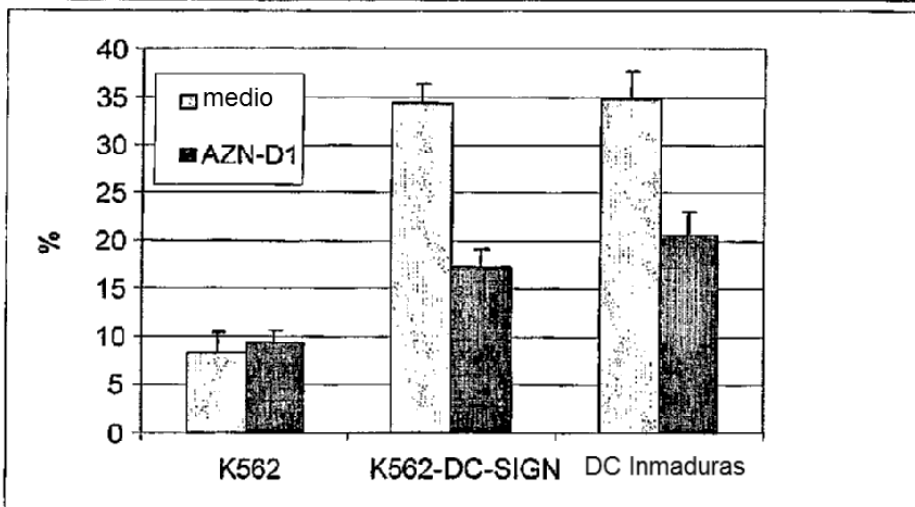
IP, inmunoprecipitación (captura)

Fig. 61

DC-SIGN Se une a células tumorales que expresan CD66e
 DC-SIGN se une al antígeno tumoral CD66e=CEA

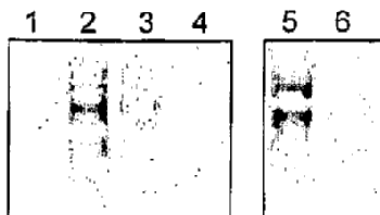


A



B

C



b. SW948 Biotinilado:

1. IP ICAM-3-Fc, IB estreptavidina,
 2. IP DC-SIGN-Fc, IB estreptavidina
 3. IP anti-CD66ae, IB estreptavidina
 4. IP anti-CD11b, IB estreptavidina
 5. IP anti-CD66ae, IB DC-SIGN-Fc
 6. IP anti-CDU_b, IB DC-SIGN-Fc
- IB, inmunotransferencia (detección/unión)
 IP, inmunoprecipitación (captura)

DC-SIGN reconoce Le^x-Le^y en células tumorales

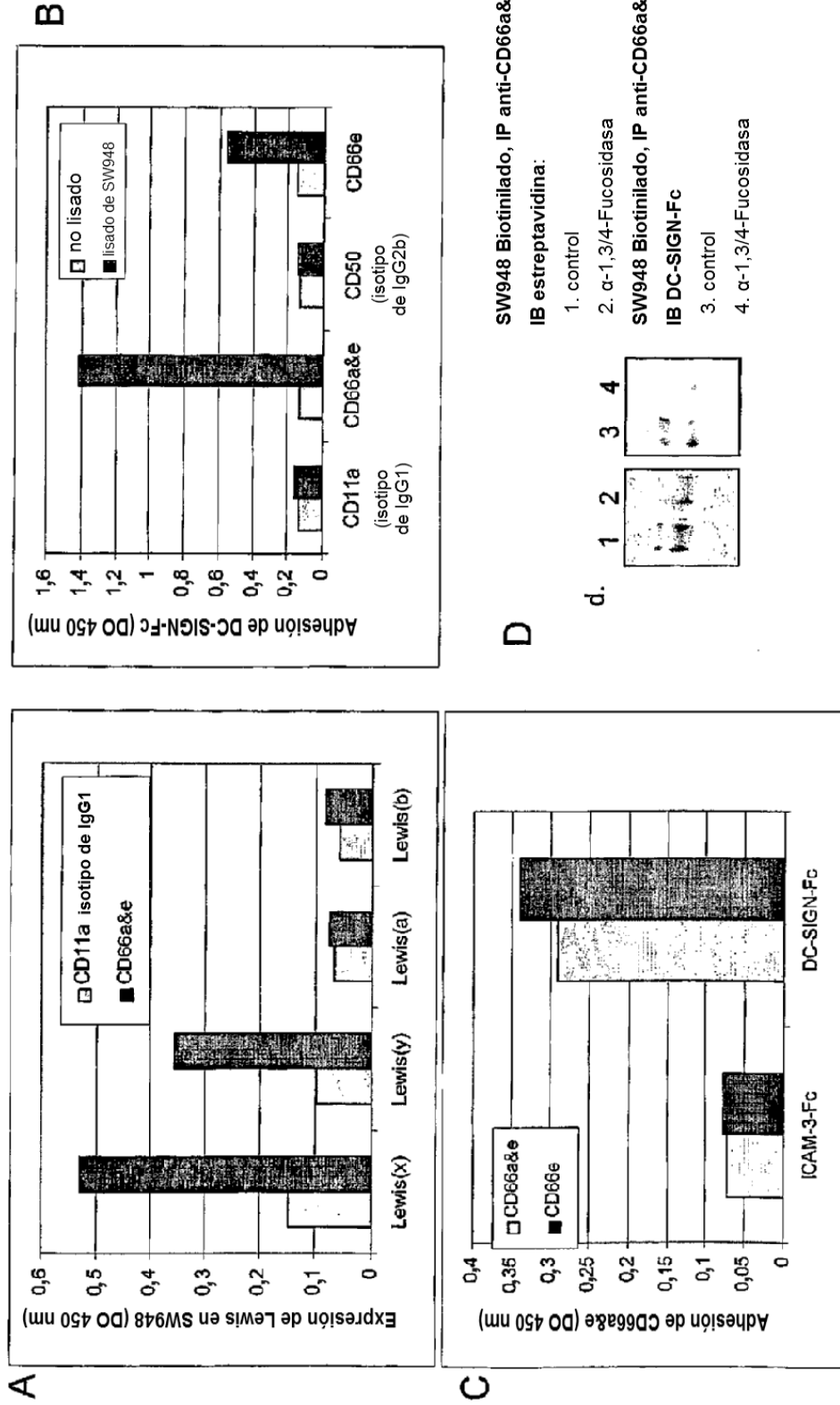


Fig. 62

Especificidad de *Neisseria meningitidis*-GlcNAc

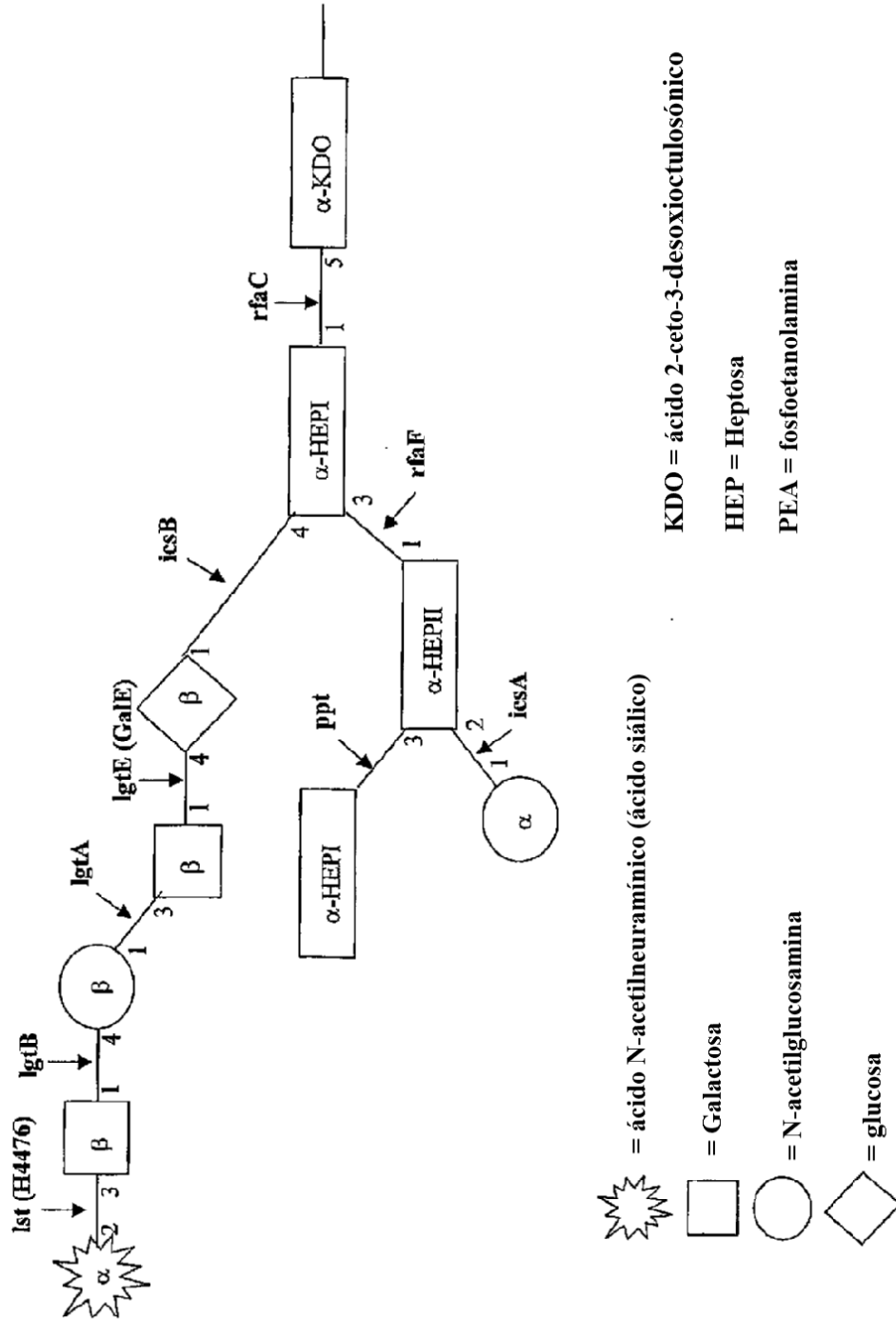


Fig. 63

Unión de *Neisseria Meningitidis* a transfectantes de 293T (100703)

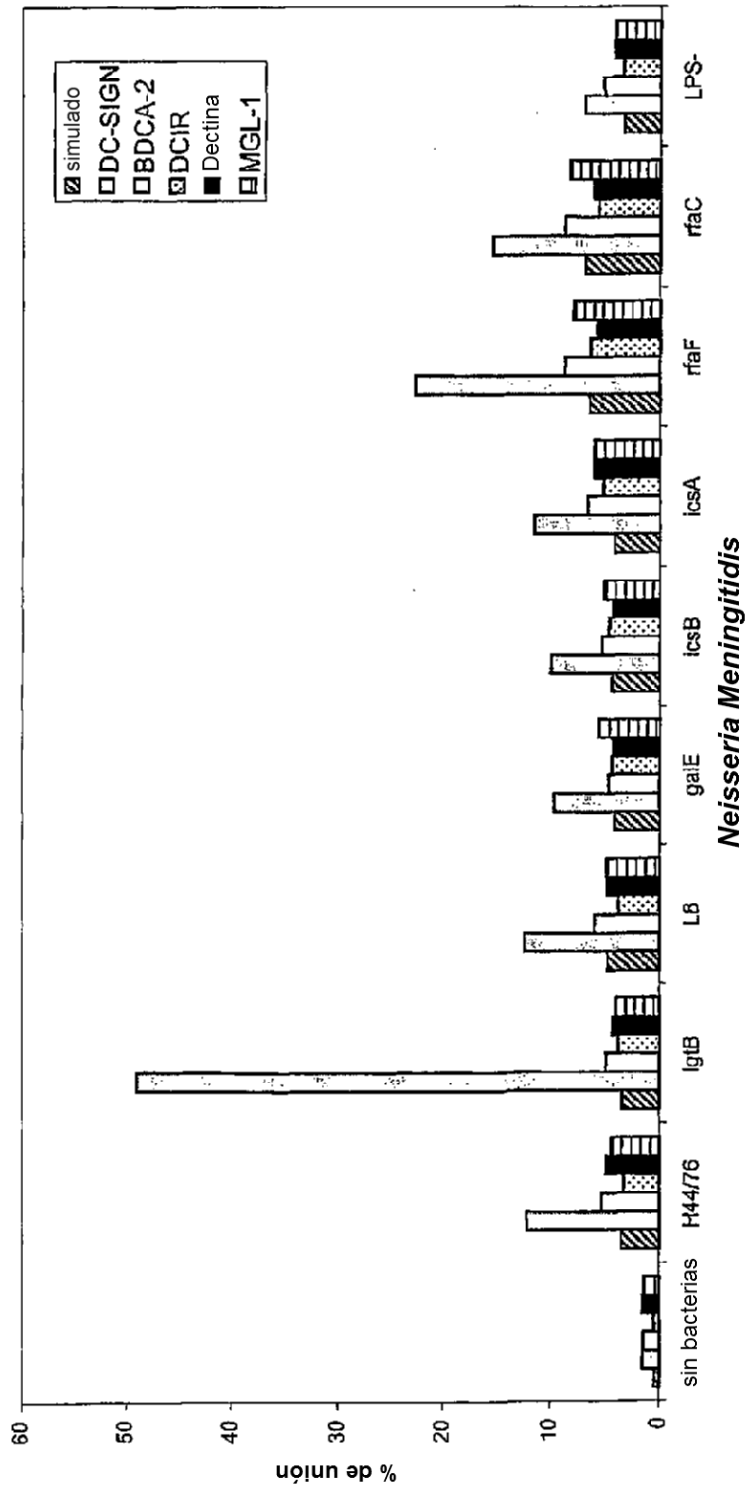


Fig. 64

Unión de *Neisseria Meningitidis* a transfectantes de DC (100703)

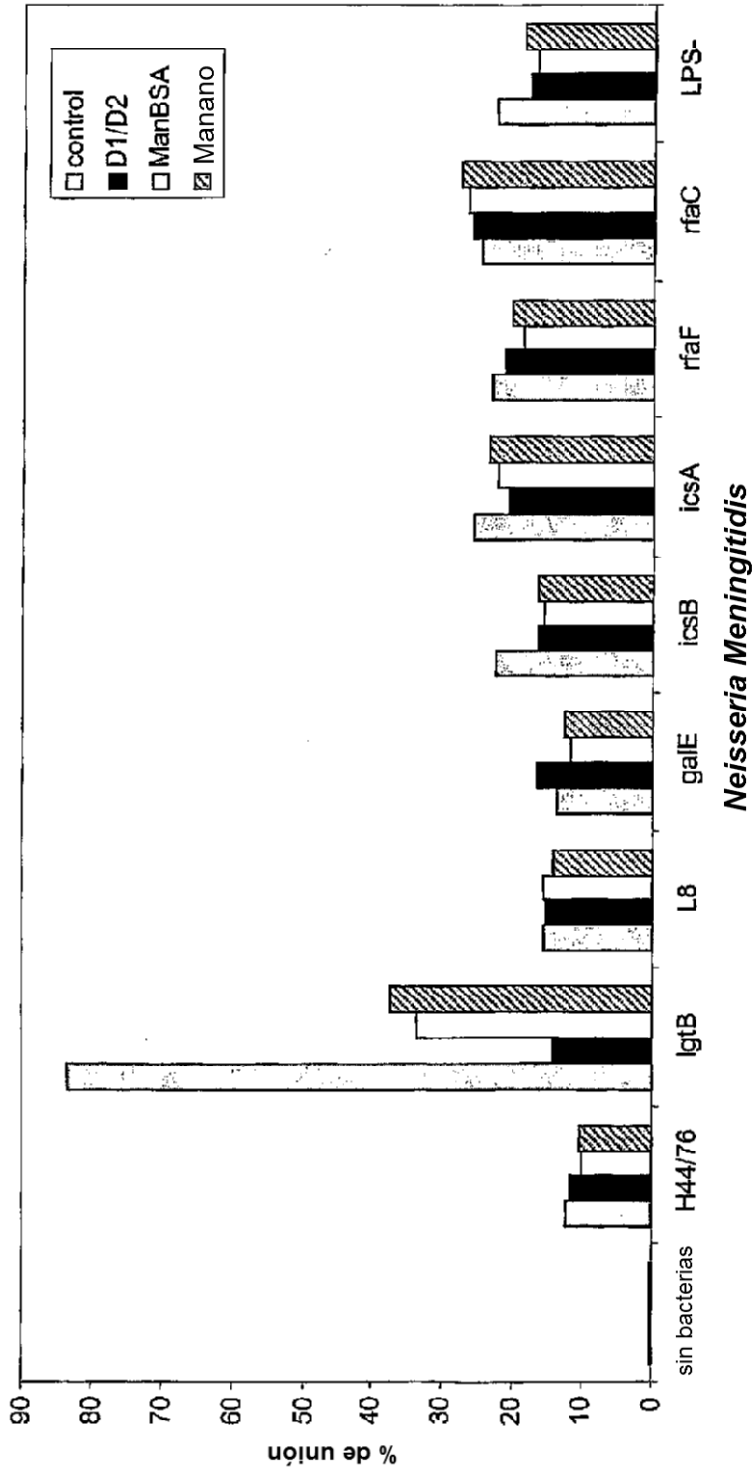


Fig. 65

Fig. 66

DC-SIGNFc se une a GlcNAc que expresa células CHOP8

