



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 504**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04793596 .0**

96 Fecha de presentación : **28.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1812459**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2007**

54

Título: **Método para la producción en masa de lectina multimérica de unión a manosa.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.06.2011

73

Titular/es: **DOBEEL Co., Ltd.**
406 Byucksantechnopia
434-6 Sangdaewon-dong Jungwon-gu
Seongnam-si, Kyonggi-do 462-716, KR

72

Inventor/es: **Moon, Hong, Mo;**
Yum, Jung, Sun;
Ahn, Byung, Cheol;
Lee, Joo, Youn y
Yoon, Jaeseung

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 360 504 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

Método para la producción en masa de lectina multimérica de unión a manosa

Campo técnico

La presente invención se refiere al desarrollo de procedimientos mediante los cuales resulta posible la producción en masa de lectina de unión a manosa humana recombinante multimérica (rhMBL).

Antecedentes de la invención

La lectina de unión a manosa (denominada "MBL" en lo sucesivo) es una proteína sérica implicada en la inmunidad natural (inmunidad innata). El peso molecular de la MBL es de 32 kDa. MBL está compuesta de un dominio C-terminal de reconocimiento de carbohidratos (CRD), un dominio de colágeno y una región rica en cisteínas en el extremo amino-terminal. Tres moléculas de MBL forman un complejo mediante la formación de una triple hélice que utiliza dominios de colágeno, y posteriormente hasta 6 complejos pueden combinarse entre sí mediante enlaces disulfuro entre moléculas (-s-s-) entre residuos cisteína en el extremo N-terminal, restando en la formación de una molécula multimérica de MBL que consta de hasta 18 moléculas de MBL.

La forma oligomérica de MBL puede formar un complejo con otras proteínas tales como las serina proteasas asociadas a MBL (MBSP-1, MASP-2 ó MASP-3) o las proteínas asociadas a MBL (Mapa 19). Aunque la estructura y función moleculares generales de la MBL implicadas en la activación del complemento son similares a las de C1q, que es el primer componente del sistema del complemento, al contrario que C1q, MBL activa el sistema del complemento mediante el corte de C4 y C2. Este proceso de activación del complemento denominado ruta de la lectina se produce mediante la activación de la serina proteasa asociada a MBL tras la unión de la MBL al microbio. La activación del sistema del complemento por parte de MBL es una de las funciones de la MBL en la defensa primaria frente a la infección microbiana, antes de que tengan lugar las respuestas inmunológicas adaptativas. La unión de la MBL al microorganismo a través de dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD), que reconocen patrones de glucosilación únicos de las proteínas superficiales de un microorganismo, es un requisito previo de la activación del complemento. La unión de la MBL al microorganismo activa los precursores asociados a la MBL de las serina proteasas MASP-1 y MASP-2, conduciendo al corte de C4 y C2 del sistema del complemento, generando C4b2a y C3b. Algunas de las proteínas generadas en la activación del complemento se unen directamente a la superficie del microorganismo a modo de opsonina, y la MBL también puede funcionar como opsonina, provocando que la fagocitosis de los microbios unidos a la MBL resulte más eficiente por parte de las células fagocíticas. Algunas proteínas del complemento activado lisan directamente los microorganismos invasores mediante la formación de un complejo atacante de membranas (MAC) y otros fragmentos proteicos del complemento producidos durante el proceso de activación estimulan la secreción de citoquinas, que causan inflamación.

Algunos informes anteriores han descrito la expresión del gen MBL en una diversidad de células, tales como células CHO, células de hepatoma HLF o células EBNA HEK293. En particular, el nivel de expresión en las células CHO era muy elevado, pero la MBL producida eran principalmente monómeros y dímeros (Katsuki Ohtani *et al.*, J. Immunol. Methods 222:135-144, 1999). La producción de forma oligomérica de MBL en células HEK293 EBNA se ha conseguido, pero la productividad bruta es inferior a 1 µg/ml (T. Vorup-Jensen *et al.*, International Immunopharmacology 1:677-687, 2001). La producción de forma oligomérica de MBL resulta críticamente importante debido a que los monómeros y dímeros consistentes de 3 subunidades y 6 subunidades, respectivamente, presentan actividades reducidas o nulas. También es una cuestión importante durante el desarrollo de un producto farmacéutico a partir de MBL la creación de una línea celular altamente productora, debido a que resulta necesaria en cantidades de muchos miligramos.

La MBL también podría desempeñar un papel importante en la inmunidad adaptativa. Las células implicadas en la fagocitosis, tales como los neutrófilos y los macrófagos, desempeñan un papel importante en la eliminación de los microorganismos foráneos invasores mediante fagocitosis. Además de lo anterior, el macrófago es una célula presentadora de antígenos (APC), que activa las células T, resultando en la inducción de una respuesta inmunológica adquirida. Por lo tanto, la MBL multimérica implicada en la activación del sistema del complemento y a modo de opsonina desempeña un papel importante no sólo en la defensa primaria como componente del sistema inmunológico innato sino también en la inducción de respuestas inmunológicas adquiridas.

La cantidad de MBL en el suero humano varía de individuo a individuo, estando comprendida entre 50 ng/ml y varios µg/ml en virtud de la variación genética del gen de la MBL. Por ejemplo, al producirse una mutación puntual en el codón 52, 54 ó 57 del exón 1 del gen MBL, las moléculas de MBL no forman formas oligoméricas, produciendo complejos más pequeños no funcionales consistentes de no más de 3 moléculas de MBL. Al producirse una mutación en las regiones promotoras del gen MBL, el nivel de expresión de MBL se reduce, resultando en una elevada variación del nivel

sanguíneo de MBL entre los individuos afectados. En general, aquellos niños o pacientes con neutropenia que presentan un nivel de MBL inferior a determinado nivel presentan una inmunidad débil, convirtiéndose en altamente susceptibles a las infecciones microbianas (Sumiya M. *et al.*, Lancet 337:1569-1570, 1991; Summerfield J.A. *et al.*, Lancet 345:886, 1995; Garred P. *et al.*, Lancet 346:941, 1995; Summerfield J. *et al.*, Br. Med. J. 314:1229, 1997; Mullighan C.G. *et al.*, Scand. J. Immunol. 51:111-122, 2000; Neth O. *et al.*, Lancet 358:614-618, 2001; Peterslund N.A. *et al.*, Lancet 358:637-638, 2001; Mullighan C.G. *et al.*, Blood 99:3524-3529, 2002).

Según un estudio sobre pacientes crónicos de infección por virus de la hepatitis B, el nivel de MBL en la sangre es un factor crítico en el pronóstico de la enfermedad (Hakozaki Y. *et al.*, Liver 22:29-34, 2002). En particular, entre los pacientes que desarrollaron insuficiencia hepática fulminante debida a la infección crónica por virus de la hepatitis B, la mortalidad de aquellos que presentaban un nivel sanguíneo de MBL superior a 3 µg/ml era de 0%, mientras que aquellos que presentaban un nivel sanguíneo de MBL de 1,5 µg/ml e inferior a 0,5 µg/ml era de 58% y más de 80%, respectivamente. Este estudio demuestra la clara relación entre el nivel sanguíneo de MBL y la mortalidad de los pacientes con una enfermedad infecciosa. Este estudio también sugiere que la suplementación de MBL en pacientes con un nivel reducido o nulo de MBL resulta beneficiosa.

Para que pueda utilizarse la MBL recombinante como agente terapéutico, la proteína MBL recombinante debe producirse en una cantidad masiva a un precio razonable en forma de moléculas oligoméricas activas. Al contrario que las citoquinas, resulta necesaria en una cantidad de muchos miligramos en cada paciente en cada aplicación. Por ejemplo, el volumen sanguíneo humano de media es aproximadamente 5 litros, requiriendo 25 mg para producir 5 µg/ml de MBL. Considerando el volumen de los demás líquidos corporales, podría requerir una cantidad mucho mayor en cada aplicación. Por lo tanto, ha sido una cuestión críticamente importante en el desarrollo del producto comercial a partir de la MBL, el establecimiento de no sólo una línea celular recombinante altamente productiva, sino también de una línea celular que produzca formas activas de MBL polimérica. Hocker B.A. *et al.*, Faseb Journal 15(5):A1012, 2001, describen la expresión y caracterización de MBL recombinante humana que conserva su estructura oligomérica de orden elevado.

De esta manera, los presentes inventores han realizado todos los esfuerzos para establecer una línea celular recombinante que pueda producir MBL en una cantidad comercial y que simultáneamente pueda producir una forma oligomérica funcional de MBL, que sea capaz de activar el sistema del complemento mediante la unión específica a glucoproteínas de unión a MBL en presencia de MASPs. Como resultado de este esfuerzo, los presentes inventores han completado la presente invención mediante la confirmación de que podía producirse rhMBL activa adecuada para la utilización terapéutica en cantidades masivas en forma de polímero multimérico en una línea celular CHO transfectada con un vector de clonación que contiene una secuencia polinucleótida codificante de rhMBL.

Descripción de los dibujos

La fig. 1 es un diagrama esquemático que muestra el mapa genético del vector plásmido pMSG-MBL.

Las figs. 2A y 2B son dibujos de la MBL producida a partir de la línea celular CHO recombinante, CHO MBL/D1-3, que ha sido transformada con pMSG-MBL. La fig. 2A es el patrón de análisis SDS-PAGE, y 2B muestra el patrón de análisis de transferencia western utilizando un anticuerpo monoclonal específico de MBL.

La fig. 3 es una fotografía de microscopía electrónica que muestra formas oligoméricas de MBL. Las moléculas oligoméricas de MBL consistentes de 2, 3, 4, 5 y 6 subunidades triméricas de MBL se observan claramente.

La fig. 4 es una fotografía de microscopía electrónica que muestra el complejo de proteína MBL recombinante y nanopartícula de oro recubierta con pre-S en presencia de ion calcio.

Las figs. 5A y 5B muestran que rhMBL se une específicamente a pre-S, una glucoproteína, o a manano, con una actividad cuantitativamente similar a la de la MBL natural.

La fig. 6 muestra la capacidad relativa de unión de una forma polimérica de gran tamaño de MBL y de una forma de pequeño tamaño, consistentes principalmente de monómeros y dímeros de subunidades triméricas. Las formas de menor tamaño presentan poca o ninguna capacidad de unión.

La fig. 7 muestra una comparación entre las capacidades de activación de C4 de una forma de gran tamaño y de una forma de pequeño tamaño de rhMBL.

La fig. 8 muestra que la rhMBL se une específicamente a diversos microorganismos.

La fig. 9 muestra que rhMBL inhibe la infección por SARS-CoV de las células renales embrionarias de mono (FRhK-4).

La fig. 10 es un conjunto de imágenes de microscopía de contraste de fases que muestra células FRhK-4 infectadas por SARS-CoV. Sin el tratamiento de rhMBL, las células no presentan una apariencia saludable, mientras que en presencia de MBL, se observan células sanas.

Exposición

Objetivo de la invención

El objetivo de la presente invención es construir una línea celular CHO que se encuentre transfectada con un vector que contiene una secuencia polinucleótida codificante de la MBL humana con el fin de producir una forma oligomérica funcional de MBL en cantidad masiva para su utilización con fines comerciales.

Además, es el objetivo de la presente invención establecer un método para la purificación de rhMBL a partir del medio de cultivo de la línea celular CHO recombinante.

Descripción resumida de la invención

La presente invención proporciona una célula huésped CHO transfectada con un vector de expresión pMSG-MBL que contiene la secuencia de la región codificante de rhMBL representada en el mapa plasmídico de la fig. 1.

La presente invención proporciona además un método para la producción en masa de MBL humana recombinante multimérica siguiendo las etapas siguientes:

- (1) preparación de células huésped CHO transfectadas con un vector de expresión pMSG-MBL que contiene la secuencia de la región codificante de la MBL humana,
- (2) producción de una MBL humana recombinante a partir de la línea celular transformada con el vector de expresión con la secuencia de la región codificante de la MBL humana en un sistema de cultivo, y
- (3) purificación de la MBL humana recombinante preparada en la etapa (2).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una célula huésped CHO transfectada con un vector de expresión pMSG-MBL que contiene un polinucleótido codificante de rhMBL representado en el mapa plasmídico de la fig. 1, que resulta suficiente para expresar la MBL humana recombinante oligomérica capaz de activar el sistema del complemento mediante la combinación específica con una glucoproteína de unión a MBL en presencia de serina proteasas asociadas a MBL.

El ADNc de la MBL humana (Gene Bank NM_000242) se insertó en el vector pMSG (nº de acceso KCCM (Centro Coreano de Cultivos de Microorganismos) 10202) que contenía el elemento MAR (región de unión a la matriz nuclear) del gen beta-globina, poli-A del virus SV-40 y complejo terminador de transcripción del gen gastrina, resultando en la construcción de un vector único denominado pMSG-MBL.

De esta manera, la presente invención proporciona células huésped transfectadas con vector de expresión que contiene el polinucleótido codificante de rhMBL que resulta suficiente para expresar la MBL humana recombinante, la cual es capaz de activar el sistema del complemento mediante la unión específica a una glucoproteína sobre la superficie de microorganismos en presencia de serina proteasas asociadas a MBL.

Las células huésped utilizadas en la presente invención son células CHO (ováricas de hámster chino).

En una realización preferente de la presente invención, se prepara un transformante mediante la introducción de un vector de clonación pMSG-MBL que contiene el polinucleótido codificante de rhMBL, el cual resulta suficiente para expresar una MBL recombinante capaz de activar el sistema del complemento mediante la unión específica a glucoproteínas presentes sobre la superficie de microorganismos en presencia de una serina proteasa asociada a MBL, en una línea celular huésped tal como las células CHO, y después adaptar los transformantes a la condición con MTX (metotrexato), conduciendo a la selección del transformante capaz de expresar en masa la proteína rhMBL en la forma de polímero multimérico. El transformante seleccionado se denominó MBL D1-3 (línea celular CHO) y se depositó en el

Korean Collection for Type Culture, Daejeon, Korea, el 16 de mayo de 2003 (nº de acceso KCTC 10472BP).

La MBL humana recombinante producida a partir del transformante descrito en la presente invención principalmente se encuentra como formas multiméricas, que resultan similares a la MBL natural en la sangre humana. La línea celular establecida en la presente invención producía principalmente forma multimérica funcional de MBL y mostraba un nivel de expresión elevado, permitiendo la utilización de la línea celular CHO transformada para la producción en masa de proteína rhMBL funcional.

La presente invención proporciona además un método para la producción de una MBL humana recombinante, que comprende las etapas siguientes:

(1) método que proporciona células huésped transfectadas con un constructo de ADN que incluye un vector de clonación que contiene el polinucleótido codificante de la MBL humana, que resulta suficiente para expresar una MBL humana recombinante capaz de activar el sistema del complemento mediante la unión específica a una glucoproteína sobre la superficie de microorganismos en presencia de serina proteasa asociada a MBL.

(2) Método para producir MBL humana recombinante mediante la expresión del polinucleótido codificante de la MBL humana en células animales y a partir de las células utilizando un sistema masivo de cultivo celular, y

(3) método para purificar la MBL recombinante producida en la etapa (2). En particular, que aprovecha las propiedades de la MBL de unión a glucoproteínas de la etapa (1), y la glucoproteína de unión a MBL se encuentra ejemplificada por la proteína de cubierta vírica glucosilada que contiene pre-S del HBV, proteína bacteriana glucosilada, proteína fúngica glucosilada y glucoproteína sintética.

En una realización preferente de la presente invención, la etapa de producción de una MBL recombinante de la etapa (2) se caracteriza por las etapas de cultivo en suspensión de las células en un medio sin suero/sin proteínas y el subcultivo de aquellas células bien adaptadas al medio sin suero/sin proteínas para el escalado gradual, resultando en la producción en masas de proteína rhMBL en forma de polímero multimérico.

En la etapa (3), se purificó una proteína MBL recombinante a partir del medio de cultivo de los transformantes de gen MBL mediante la utilización de cromatografía de intercambio aniónico y la capacidad de unión de la MBL a pre-S del virus de la hepatitis B. El método de purificación de la MBL consta de las etapas siguientes: (a) fraccionamiento de las muestras que contiene MBL humana recombinante multimérica mediante la utilización de cromatografía de intercambio aniónico, (b) preparación de la columna mediante el empaquetamiento de sustrato al que se inmoviliza pre-S de virus de la hepatitis B, (c) captura de las MBLs recombinantes específicamente sobre pre-S de virus de la hepatitis B inmovilizado, al pasar por la columna una muestra que contiene las proteínas MBL recombinantes en presencia de ion calcio, tras equilibrar la columna con un tampón que contiene ion calcio, y (d) elución de las proteínas MBL recombinantes mediante la adición de una solución tampón suplementada con EDTA o EGTA a la columna en la que se había capturado la MBL recombinante en la etapa (c).

En la etapa (a), se utilizó un material que se utiliza generalmente para la cromatografía de intercambio aniónico, y uno de este tipo de materiales es la Q-seferosa. La muestra que contenía las proteínas MBL en forma de monómero o dímero se fraccionó en presencia de NaCl 150 a 200 mM, y la otra parte que contenía una proteína MBL de elevado peso molecular en forma de copolímero se eluyó en presencia de NaCl 350 a 400 mM.

En la etapa (b), se utilizó un sustrato utilizado generalmente para la cromatografía de afinidad, y la seferosa es uno de los sustratos utilizados generalmente.

En la etapa (c), se llevó a cabo el equilibrado de la columna mediante la adición de una solución tampón o de la misma solución utilizada para la unión de afinidad de MBL recombinante y pre-S del virus de la hepatitis B. La unión de la MBL recombinante a pre-S del virus de la hepatitis B preferentemente se llevó a cabo en presencia de iones calcio, y en ese momento, la concentración de calcio preferentemente era de entre 2 y 20 mM. Una muestra que contuviese una proteína MBL recombinante podía ser un sobrenadante obtenido a partir de medio del cultivo celular transformante producto de MBL o solución de MBL eluida en la columna de fraccionamiento de MBL mencionada anteriormente.

En la etapa (d), se llevó a cabo la elución de la proteína rhMBL utilizando una solución tampón EDTA o EGTA en ausencia de iones calcio. La solución tampón podía ser la solución que contenía EDTA o EGTA en una concentración de entre 2 y 10 mM, por ejemplo agua destilada o tampón Tris-Cl, pH 7,4.

El eluyente preparado en la etapa (d) se secó por congelación o se dializó antes del secado por congelación, resultando en una proteína MBL recombinante purificada.

El método de purificación de la proteína rhMBL de la presente invención también resulta aplicable a la purificación de MBL obtenida a partir de muestras biológicas naturales, además de proteína MBL recombinante preparada a partir del transformante. La muestra biológica puede ejemplificarse con sangre, plasma o suero.

La MBL humana recombinante de la presente invención es similar a la forma natural purificada a partir de sangre humana. Es una forma oligomérica y activa en la unión al microorganismo, activando de esta manera el sistema del complemento. Un nivel de producción de alto rendimiento (50 µg/millón de células/día) garantizaría la producción comercial de MBL funcional para el desarrollo de producto. La rhMBL producida de esta manera podría utilizarse eficazmente para el tratamiento de un individuo infectado por virus, bacterias u hongos. También podría utilizarse para la producción de un kit diagnóstico para la detección de MBL humana recombinante.

Ejemplos

Las realizaciones prácticas y actualmente preferentes de la presente invención son ilustrativas, tal como se muestra en los Ejemplos siguientes.

Ejemplo 1: preparación de un gen MBL transformante y expresión de una MBL humana recombinante

<1-1> Construcción de un vector de expresión

Se construyó pEZ-MBL 2-5 mediante la clonación de ADNc de MBL obtenido mediante PCR a partir de una biblioteca de ADNc de hepatocitos humanos en el vector pEA, y después se confirmó que la secuencia de nucleótidos del ADNc de la MBL era auténtica a partir de la secuencia de nucleótidos conocida de la MBL (Gene Bank NM_000242). Se llevó a cabo una PCR mediante la utilización de pEZ-MBL 2-5 como molde y utilizando un conjunto de cebadores (cebador directo 1 y cebador inverso 2) para amplificar el ADNc de la MBL, de un tamaño aproximado de 750 kb. Cada cebador contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción y una secuencia de Kozak, de manera que se amplificaba la región codificante completa. A continuación, se preparó pMSG-MB mediante la clonación del ADNc de MBL en el vector pMSG (nº de acceso KCCM 10202) y después se confirmó la secuencia de nucleótidos insertada (fig. 1).

Cebador directo 1 (SEC ID nº 1)
ctagctagcc accatgtccc tgttccatc actc (34mero)
Cebador inverso 2 (SEC ID nº 2)
gaagatctca gataggaac tcacagacg (29mero)

<1-2> Transformación de célula huésped con pMSG-MBL

<1-2-1> Preparación de ADN del plásmido de expresión pMSG-MBL

Se transfectó *E. coli* con pMSG-MBL y el transformante resultante se cultivó en 100 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina (Sigma, USA). Se separó el ADN de pMSG-MBL mediante el kit de purificación de plásmido (kit QUIAPREP Plasmid Midi, Qiagen, USA). El ADN purificado se dirigió con el enzima de restricción Scal para linearizarlo, separándolo con el kit de purificación de productos de PCR (kit de purificación de productos PCR QIAquick, Qiagen, USA).

<1-2-2> Preparación de células huésped

Tras cultivar las células huésped CHO DG44 (dhfr⁻/dhfr⁻) en medio α-MEM suplementado con cFBS al 10%, se realizó un recuento del número de células con un hemocitómetro. Las células se distribuyeron (2x10⁵ células/pocillo) en medio α-MEM suplementado con cFBS al 10%, que se cultivaron en un incubador de CO₂ durante 24 horas.

<1-2-3> Transformación

Se mezclaron 2 µg de vector pMSG-MBL con 5,3 µl de Dosper TM y 16 ng de ADN de vector pDCHIP (plásmido que contenía el gen DHFR, Venolia L. *et al.*, Somat. Cell Mol. Genet. 13:491-501, 1987) para inducir la reacción a temperatura ambiente durante 45 minutos. El producto resultante se añadió a las células huésped. Las células se cultivaron a 37°C durante 6 horas, y después se sustituyó el medio por medio α-MEM fresco que contenía cFBS al 10% (3 ml/pocillo), seguido del cultivo adicional. Dos a tres días después, tras crecer suficientemente las células transformadas, se añadió tripsina y se añadieron 2 ml de α-MEM (w/o) que contenía dFBS al 10% a las células (4x10⁵

células/pocillo), seguido nuevamente del cultivo adicional. Cada 2 a 3 días, se sustituyó el medio por medio fresco y se observó bajo el microscopio la condición de las células y la formación de colonias individuales. Diez días después, se obtuvieron células tempranas adaptadas.

5 <1-3> Selección de una línea celular de expresión de MBL y amplificación del gen MBL

Tras obtener células tempranas adaptadas, se incrementó gradualmente la concentración de MTX (metotrexato) en el medio, induciendo la amplificación del gen MBL insertado en las células transformadas. Las células se distribuyeron en pocillos a razón de 4×10^5 células/pocillo y después se cultivaron en un medio (α -MEM + dFBS al 10%) suplementado con
 10 MTX 10 nM hasta la confluencia, durante el cual se sustituyó el medio por uno fresco cada 2 a 3 días. Las células se distribuyeron nuevamente a razón de 4×10^5 células/pocillo y se adaptaron a un medio suplementado con MTX 100 nM siguiendo el mismo procedimiento utilizado anteriormente, y después se adaptaron nuevamente a la condición de MTX 1 μ M. Durante la amplificación del gen MBL, se llevó a cabo un análisis de transferencia western en cada etapa para observar los cambios del nivel de expresión de MBL. En este análisis se observó que se incrementaba la expresión de
 15 MBL al incrementarse el contenido de MTX en el medio.

<1-4> Selección de una línea de células individuales

Con el fin de separar una línea de células individuales que mostrase una tasa elevada de expresión de MBL, se distribuyeron las células cultivadas en un medio (α -MEM + dFBS al 10%) que contenía MTX 1 μ M en una placa de 96
 20 pocillos para preparar 0,5 células/pocillo, y después se cultivaron en un medio que contenía MTX 1 μ M. Tras 2 semanas, tras confirmar la formación de una única colonia, las células se transformaron a una placa de 24 pocillos, que se cultivo adicionalmente hasta que las células hubiesen proliferado suficientemente. Algunas de ellas se congelaron y se almacenaron, y algunas de ellas se utilizaron para la comparación de las expresiones mediante análisis de transferencia
 25 western. Se seleccionó un transformante D1-3 de células individuales, que demostró producir una forma de alto peso molecular de MBL en una gran cantidad, como línea celular de la presente invención. El transformante seleccionado se denominó MBL D1-3 (línea celular CHO) y se depositó en la Korean Collection for Type Culture, Daejeon, Korea, el 16 de mayo de 2003 (nº de acceso KCTC 10472BP). El análisis PAGE de la proteína MBL recombinante expresada a partir del transformante se llevó a cabo bajo condiciones no desnaturalizantes y se encontró que era la forma multimérica de la
 30 MBL, que presenta características muy similares a las de la MBL natural originada en el ser humano.

<1-5> Cuantificación de la MBL recombinante expresada en un transformante

Basándose en la cantidad estándar de MBL purificada obtenida a partir de suero humano, se estimó el nivel de expresión de proteína MBL recombinante a partir de las células CHO MBL/D1-3 transformadas. Las células se distribuyeron en un
 35 matraz T25 a una concentración de 5×10^5 y después se cultivaron en un medio (α -MEM(w/o) + dFBS al 10%) hasta una confluencia del 90%. A continuación, se añadieron 3 ml de medio (α -MEM(w/o) + dFBS al 5%) a las mismas y se cultivaron adicionalmente durante 4 días. El medio de cultivo se diluyó 10 veces, seguido del análisis de transferencia western. Se comparó el resultado con la cantidad estándar de MBL natural. A partir de lo anterior, se confirmó que el
 40 nivel de expresión de proteína MBL recombinante era de aproximadamente $50 \mu\text{g}/10^6$ células/día cultivadas en un matraz de cultivo celular.

Ejemplo 2: método para la producción en masa de proteína rhMBL

45 <2-1> Preparación de una línea celular adaptada para el cultivo en suspensión en un medio sin suero

Se cultivó la línea celular que expresaba MBL dependiente de anclaje en medio α -MEM (w/o) suplementado con dFBS al 10% y MTX 1 μ M. Tras recuperar las células viables, se inocularon en un matraz de agitación de 250 ml que contenía
 50 100 ml de medio HyQ SFM4 CHO sin proteínas (Hyclone, USA) suplementado con bicarbonato sódico al 0,15% con un tamaño de inóculo de 5×10^5 células/ml. El cultivo en el matraz de agitación se llevó a cabo a 37°C en un incubador con 5% de CO₂, agitándolo a 40 rpm durante todo el periodo de cultivo. Tras alcanzar el número de células un nivel de entre $1,0$ y $2,0 \times 10^6$ células/ml, las células se inocularon nuevamente en 100 ml de medio HyQ SFM4 CHO suplementado con bicarbonato sódico al 0,1% con un tamaño de inóculo de 5×10^5 células/ml. Se determinó la viabilidad de las células mediante el método de exclusión de azul tripán. En particular se confirmó una viabilidad de 90% en el periodo tardío de
 55 adaptación.

Las células adaptadas al medio sin suero/sin proteínas se cultivaron hasta que la densidad celular alcanzó $2,5 \times 10^6$ células/ml. A continuación, se recuperaron las células y se resuspendieron en un medio de congelación. Se distribuyeron las células en viales criogénicos hasta alcanzar la concentración de $2,8 \times 10^7$ células/ml, y después se almacenaron en un

tanque de nitrógeno líquido.

<2-2> Desarrollo de un cultivo de biorreactor mediante la utilización de una línea celular adaptada para el cultivo en suspensión sin suero

- 5 Se inocularon las células para el cultivo en suspensión en un matraz de agitación de 250 ml que contenía 100 ml de medio sin suero/sin proteínas (medio HyQ SFM4 CHO) suplementado con bicarbonato sódico al 0,15% con un tamaño de inóculo de 5×10^5 células/ml. Al incrementarse el número de células a un nivel de entre $1,0$ y $2,0 \times 10^6$ células/ml, las células se inocularon en un matraz de agitación de 500 ml que contenía 200 ml de medio HyQ SFM4 CHO con un inóculo de 5×10^5 células/ml. A continuación, se incrementó el número de células nuevamente a 2×10^6 células/ml, las células se inocularon en un matraz de agitación de 1.000 ml que contenía 400 ml de medio HyQ SFM4 CHO con un inóculo de 5×10^5 células/ml. De esta manera, las células se cultivaron mediante escalado gradual, resultando en la preparación de 1 litro de cultivo de siembra con una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/ml.
- 10
- 15 Se inoculó el cultivo celular de siembra preparado anteriormente en un biorreactor de 7,5 litros (volumen de trabajo de 5 litros) y se cultivaron a 34°C durante 5 días (50 rpm, DO 50, pH 7,2 a 7,4).

Ejemplo 3: método para la purificación de proteína MBL humana recombinante multimérica

- 20 Se cultivaron células CHO que expresaban MBL en medio HyQ SFM4 CHO y después se centrifugó el medio de cultivo y se pasó a través de un filtro de membrana de 0,45 μm para eliminar las células. Se llevaron a cabo cromatografías de intercambio aniónico y de afinidad para purificar las proteínas MBL recombinantes. Se determinó la cantidad de proteínas purificadas mediante la utilización de un kit ELISA de MBL.

25 <3-1> Fraccionamiento de una muestra que contiene polímero multimérico mediante la utilización de una columna de Q-sefarosa

- Tras optimizar el pH y la conductividad del sobrenadante, la forma de menor tamaño de MBL, tal como monómeros y dímeros, se separó mediante la utilización de una columna empaquetada con Q-sefarosa y sólo se recolectó la MBL de las formas de mayor tamaño. La muestra que contenía la forma de menor tamaño de MBL se fraccionó pasándola a través de solución tampón de NaCl 150 a 200 mM y la muestra que contenía la forma mayor de MBL se eluyó con solución tampón de NaCl 350 a 400 mM. Este resultado demostró que más de 80% se expresaba en forma de copolímero de alto peso molecular de la MBL a partir de la línea celular establecida en la presente invención (fig. 2A).
- 30

35 <3-2> Preparación de columna de pre-S-sefarosa

- La proteína pre-S recombinante utilizada en la presente invención se obtuvo mediante la expresión del gen pre-S, que es una parte de la proteína superficial del virus de la hepatitis B, en *Saccharomyces cerevisiae*, y después se purificó en forma de moléculas altamente glucosiladas (publicación de patente internacional WO n° 02/094866).
- 40

- Se disolvió un gramo de polvos de sefarosa 4B activada con CNBr en HCl 1 mM, seguido del lavado repetido. Con el fin de utilizar proteína pre-S recombinante como ligando, se disolvieron 6,4 mg de proteína pre-S en tampón de acoplamiento (NaHCO_3 0,2 M, NaCl 0,5 M y pH 8,3), haciendo que la concentración de la resinas de sefarosa 4B activadas con CNBr fuese de entre 0,5 y 10 mg/ml y se mezclaron con la solución de pre-S y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, la mezcla se transfirió a tampón de bloqueo (Tris-Cl 0,1 M, pH 8,0), seguido de una reacción adicional a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras el lavado, se confirmó mediante análisis de transferencia western que la pre-S inmovilizada en sefarosa era prácticamente en su totalidad proteína pre-S recombinante, que se utilizó para la purificación de la proteína MBL recombinante. Finalmente, se preparó una columna de pre-S-sefarosa para la purificación de MBL humana recombinante mediante el empaquetamiento de pre-S-sefarosa 4B en una columna.
- 45
- 50

<3-3> Purificación de una MBL humana recombinante

- La columna rellena con pre-S-sefarosa se equilibró con un tampón de unión (Tris 20 mM, NaCl 150 mM y CaCl_2 10 mM, pH 7,6). La fracción de columna de la Q-sefarosa que contenía las proteínas MBL recombinantes o un medio de cultivo que contenía MBL se cargó en una columna para adsorber la MBL. A continuación, se lavó la columna varias veces con el tampón de unión. Se pasó el tampón de elución (Tris 20 mM, NaCl 150 mM y EDTA 5 mM, pH 7,6) sin Ca^{2+} por la columna para eluir la MBL humana recombinante. El eluyente obtenido se investigó mediante SDS-PAGE. Como resultado se obtuvo MBL humana recombinante purificada que mostraba una pureza de 99,9% (figs. 2A y 2B).
- 55

Ejemplo 4: verificación de una MBL humana recombinante multimérica mediante EM y a partir de la actividad de unión de MBL a la superficie de un microorganismo

5 <4-1> Confirmación de la formación de una MBL humana recombinante multimérica

Con el fin de confirmar que una MBL humana recombinante purificada formaba o no un polímero multimérico en forma de racimo, se creó la MBL humana recombinante purificada con carbono amorfo, y después se observó la forma de la proteína bajo microscopía electrónica de transmisión (Tecnai 12, FEI, Países Bajos) y se encontró que la MBL humana recombinante purificada eran polímeros multiméricos en forma de racimo (fig. 3).

<4-2> Unión de MBLs humanas recombinantes a partículas de oro recubiertas con pre-S

Se observó la capacidad de unión de la MBL humana recombinante a la superficie de un microorganismo mediante la utilización de pre-S, una proteína de superficie del virus de la hepatitis B. Las proteínas pre-S se unieron a la superficie de partículas de oro de entre 20 y 40 nm de tamaño, que imitaban, de esta manera, a un microorganismo. Se añadieron MBLs humanas recombinantes a las mismas en presencia de calcio. A continuación, se detectó la unión de la MBL humana recombinante a las proteínas pre-S utilizando un microscopio electrónico de transmisión Tecnai 12, resultando en la confirmación de la formación de un complejo. Tal como se muestra en la fig. 4, las proteínas pre-S de recubrimiento de las partículas de oro se encontraban circundadas por MBLs humanas recombinantes en presencia de iones calcio. Esto muestra la apariencia de la unión de rhMBL a la superficie de un microorganismo. De hecho, la unión de MBL a un microorganismo podría bloquear mecánicamente la infectividad del organismo, especialmente de virus, de las células, además de activar el sistema del complemento y actuar como opsonina.

25 **Ejemplo 5: confirmación de la actividad de unión de la MBL humana recombinante**

Con el fin de investigar la actividad biológica de la rhMBL, se sometió a ensayo la actividad de unión a pre-S y a manano en presencia de iones calcio.

Se distribuyó manano o proteína pre-S del virus de la hepatitis B disueltos en solución de tampón carbonato-bicarbonato 50 mM en una placa de microtitulación (inmunoplaaca Nunc Maxisorp) para preparar 1 µg en cada pocillo, que seguidamente se incubó durante la noche a 4°C. La placa recubierta con pre-S o manano se lavó con un tampón de lavado (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween-20 al 0,05%, pH 7,6) cuatro veces, seguido del bloqueo con BSA al 0,2% a temperatura ambiente durante una hora. Tras el lavado con tampón de lavado tres veces, se añadió suficiente MBL a cada pocillo para preparar la cantidad de MBL en cada pocillo que se indica en la figura. Para ello, se prepararon diluciones en serie a partir de 1 µg de MBL humana recombinante en 1 ml de tampón de unión (Tris 20 mM, NaCl 1 M, CaCl₂ 10 mM, BSA al 0,1%, Tween-20 al 0,05%, pH 7,6) con el fin de preparar la cantidad necesaria de MBL en 100 µl, que después se añadió a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se lavaron con el tampón de lavado 6 veces nuevamente. A continuación, se diluyeron 10.000 veces anticuerpos monoclonales de ratón anti-MBL humana y se añadieron 100 µl a cada pocillo, seguido de la incubación a 37°C durante 1 hora. Se diluyó 10.000 veces la IgG-HRP anti-ratón y se añadieron 100 µl a cada pocillo. Se incubó la placa a 37°C durante una hora y seguidamente se reveló el color mediante la adición de 150 µl de solución de TMB. Tras 20 minutos, se terminó la reacción mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ 2 M - se midió la DO₄₅₀ utilizando un lector de placas de ELISA (Multiskan Ex, Labsystems, USA). La fig. 5A muestra la unión de la MBL natural que se ha purificado a partir de suero humano, a manano y a la proteína pre-S, y la fig. 5B muestra la unión de la MBL humana recombinante a pre-S y a manano. En conclusión, la MBL humana recombinante y la MBL que es natural del ser humano presentaban actividades de unión similares a pre-S y a manano, aunque ninguna de ellas se unía a albúmina de suero bovino (figs. 5A y 5B).

50 **Ejemplo 6: comparación de la actividad biológica de la MBL humana recombinante multimérica de alto peso molecular y de la MBL humana recombinante oligomérica de bajo peso molecular**

Se investigó la actividad biológica de las formas de mayor y menor tamaño de la MBL humana recombinante con el fin de confirmar cuál de las proteínas MBL humanas recombinantes, la forma de mayor o de menor tamaño, que incluía monómeros y dímeros, se unía más eficientemente a pre-S y a manano en presencia de iones calcio.

<6-1> Unión de MBL a proteína pre-S glucosilada

Se recubrió una placa con proteínas pre-S (inmunoplaaca Nunc Maxisorp) bajo condiciones iguales a las indicadas en el Ejemplo 5. A continuación, se disolvió la forma de mayor o menor tamaño en un tampón de unión (Tris 20 mM, NaCl 1

M, CaCl₂ 10 mM, BSA al 0,1%, Tween-20 al 0,05%, pH 7,6) y se añadieron a una placa recubierta con pre-S a las diferentes concentraciones para preparar la cantidad deseada para cada pocillo. El resto de los ensayos de unión se llevó a cabo tal como en el Ejemplo 5. Tal como se ha indicado anteriormente, la actividad de unión de la MBL a las proteínas pre-S es mucho mayor al utilizar la MBL humana recombinante multimérica que al utilizar la forma de menor tamaño que contenía principalmente monómeros y dímeros (fig. 6).

<6-2> Activación de C4 en el sistema del complemento

Se recubrió una inmunoplaaca Nunc Maxisorp con 500 ng de proteínas pre-S en cada pocillo, a las que se añadieron diferentes concentraciones de MBLs humanas recombinantes, permitiendo la unión de la MBL a pre-S a temperatura ambiente durante 2 horas. A modo de fuente de proteína MASP, se añadieron 100 µl de suero sin MBL diluido 100 veces a cada pocillo y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó con un tampón de lavado 6 veces y después se añadieron 500 ng de C4, seguido de la reacción posterior a temperatura ambiente durante 2 horas. Se diluyó el anticuerpo anti-C4-HRP 2.000 veces y se añadieron 100 µl a cada pocillo. A continuación, se dejó que tuviese lugar la reacción a temperatura ambiente durante una hora. Se añadieron ciento cincuenta µl de solución de OPD y se dejó que se desarrollase el color durante 20 minutos. Seguidamente, se midió el depósito de C4b tras la adición de 50 µl de HCl 3 M y se leyó la DO a 492 nm utilizando un lector de placas de ELISA (fig. 7). Para los experimentos, se utilizaron tanto MBLs humanas recombinantes multiméricas en la forma de mayor tamaño proporcionada por la presente invención como MBLs humanas recombinantes en la forma menor tales como monómeros o dímeros, respectivamente, para la comparación de sus actividades. Tal como se muestra en la fig. 7, C4 resultó fuertemente activada por la MBL humana recombinante multimérica en forma mayor mientras que prácticamente no resultó activada por las proteínas en forma menor. Por lo tanto, se confirmó que las MBLs humanas recombinantes en forma de polímero multimérico proporcionadas por la presente invención presentan una excelente actividad de activación de C4.

Ejemplo 7: unión de MBL humana recombinante a diversos microorganismos

Se cultivaron once cepas, incluyendo tanto bacterias Gram-positivas como bacterias Gram-negativas, y hongos, en medio líquido apropiado para cada una de ellas. Para inmovilizar la célula bacteriana cultivada, se distribuyeron 100 µl de células en cultivo en una placa (inmunoplaaca Maxisorp, Nunc) para preparar 1x10⁶ células/pocillo y se incubaron a 4°C durante la noche. Se llevó a cabo el bloqueo mediante la utilización de BSA al 0,2% a 37°C durante una hora. Se añadieron quinientos ng de MBL humana recombinante en 100 µl de tampón de unión (Tris 20 mM, NaCl 1 M, CaCl₂ 10 mM, BSA al 0,1%, Tween-20 al 0,05%, pH 7,6) a cada pocillo, seguido de la reacción a 37°C durante una hora. Se diluyó 10.000 veces anticuerpo monoclonal MB1B5 de ratón anti-MBL humana (Dobeel Corp., Corea) y se añadieron 100 µl a cada pocillo, seguido de la reacción a 37°C durante una hora. Se diluyó 10.000 veces anti-IgG de ratón-HRP y se añadieron 100 µl a cada pocillo, seguido de la reacción a 37°C durante una hora. A continuación, se añadieron 100 µl de solución TMB a la misma y se dejó que se desarrollase el color durante 30 minutos. Se terminó la reacción mediante la adición de 50 µl de solución de parada (H₂SO₄) y después se midió la DO₄₅₀ mediante la utilización de un lector de placas de ELISA (Multiskan Ex, Labsystems, USA).

Los microorganismos utilizados en la presente invención mostraban una actividad de unión diferente a la de una MBL humana recombinante, y tal como se muestra en la fig. 8, *C. albicans*, *H. influenzae* ATCC 51907, *S. aureus* CCARM 3197 y *S. aureus* ATCC 29213 mostraban una actividad de unión muy alta a proteína MBL recombinante, mientras que *S. pyrogenes* ATCC 8668, *S. aureus* CCARM 3114 y *E. faecalis* ATCC 29212 mostraban un nivel moderado de actividad de unión. *K. pneumoniae* ATCC 10031, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* CCARM 35048 y *E. faecium* CCARM 5028 presentaban una actividad de unión reducida a MBL. En conclusión, se demostró que una MBL humana recombinante, al igual que una MBL natural, se une a los microorganismos mediante el reconocimiento del patrón de una proteína superficial glucosilada y que la actividad de unión varía según el microorganismo diana.

Ejemplo 8: inhibición de la infección por SARS-CoV por parte de la MBL humana recombinante

Las células FRhk-4, células renales de mono, se cultivaron en MEM. A la solución de cultivo se añadió MBL humana recombinante, que después se infectó con SARS-CoV. La MBL humana recombinante se diluyó con medio de cultivo celular cuatro veces, en serie partiendo de una concentración de 2,5 µg/ml y se utilizó un aislado primario de SARS-CoV procedente de un paciente (Ksiazek T.G. *et al.*, N. Eng. J. Med. 348:1953-1966, 2003; Peiris *et al.*, Lancet 361:1319-1325, 2003).

Con el fin de confirmar si las células huésped se encontraban infectadas o no por SARS-CoV, se llevó a cabo una PCR en tiempo real cuantitativa replicada (sistema PCR GeneAmp, Applied Biosystems, USA) con un conjunto de cebadores

específicos para SARS-CoV. Las células FRhk-4 infectadas por SARS-CoV y no tratadas con una MBL humana recombinante se utilizaron a modo de grupo de control.

5 Tal como se muestra en la fig. 9, la infección por SARS-CoV resultó inhibida por el tratamiento de MBL humana recombinante de un modo dependiente de la dosis. Por ejemplo, al cultivar las células en presencia de MBL humana recombinante en una concentración de 2,5 µg/ml, se inhibió la proliferación del virus en gran medida (proliferación inferior al 15%) en comparación con el grupo de control. Este 15% muy probablemente era el resultado del inóculo vírico.

10 La fig. 10 es una fotografía de un microcopio de contraste de fases que muestra células FRhk-4 infectadas por SARS-CoV. En la fig. 10(1) no se observan células sanas en el grupo de control, no tratado con MBL humana recombinante, mientras que en las figs. 10 (2)-(6) se observan células sanas en los grupos de ensayo tratados con MBL humana recombinante. En particular, se incrementó el número de células sanas a medida que se incrementaba la concentración de MBL humana recombinante.

15 Aplicabilidad industrial

Tal como se ha ejemplificado anteriormente en la presente memoria, los métodos para la producción de lectina de unión a manosa humana recombinante multimérica (rhMBL) en cantidades masivas proporcionados en la presente invención son un avance significativo en el desarrollo de VIBL como producto comercial útil. En particular, la forma multimérica de MBL se une eficientemente a los microorganismos, y de esta manera podría inhibir eficientemente la infección por virus, bacterias u hongos, de manera que podría utilizarse para el desarrollo de un medicamento destinado a la prevención y/o tratamiento de la infección por microorganismos tales como virus, bacterias, hongos, en particular SARS-CoV, y para la producción de un kit diagnóstico destinado a la detección de la MBL humana.

25

<110> Dobeel Co., Ltd.

<120> MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN EN MASA DE LECTINA DE UNIÓN A MANOSA MULTIMÉRICA

30

<130> 4FPO-09-02

<140> PCT/KR2004/002739

<141> 2004-10-28

35

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

40

<210> 1

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Cebador directo 1 para la amplificación del ADNc de la MBL

<400> 1.

ctagctagcc accatgtccc tggtt ccatc actc 34

50

<210> 2

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Cebador inverso 2 para la amplificación del ADNc de la MBL

<400> 2

gaagatctca gat agggaac tcacagacg 29

REIVINDICACIONES

1. Línea de células huésped CHO transfectadas con un vector de expresión pMSG-MBL ilustrado en un mapa plasmídico de la fig. 1 que contiene un polinucleótido codificante de la lectina humana de unión a manosa (MBL humana).
2. Línea de células huésped CHO según la reivindicación 1, en la que la línea celular es la línea MBL D1-3 de células CHO depositada en la Korean Collection for Type Culture bajo el nº de acceso KCTC 10472BP.
3. Método para la producción en masa de MBL humana recombinante multimérica (rhMBL), que comprende las etapas siguientes:
 - (1) preparación de las líneas de células huésped CHO transfectadas con un vector de expresión pMSG-MBL ilustrado en un mapa plasmídico de la fig. 1 que contiene la secuencia de la región codificante de la MBL humana,
 - (2) producción de rhMBL mediante la expresión de la secuencia de la región codificante de la MBL humana en dichas células huésped CHO y a partir del cultivo de dichas células, y
 - (3) purificación de la rhMBL preparada en la etapa (2).
4. Método según la reivindicación 3, en el que la línea de células huésped CHO es la línea MBL D1-3 de células huésped CHO depositada bajo el nº de acceso KCTC 10472BP.
5. Método según la reivindicación 3, en el que la etapa (2) se caracteriza por las etapas siguientes:
 - cultivo en suspensión de las células en un medio sin suero/sin proteínas, y
 - subcultivo de aquellas células bien adaptadas al medio sin suero/sin proteínas para el escalado gradual de las mismas, resultando en la producción en masa de proteína rh-MBL en forma de polímero multimérico.
6. Método según la reivindicación 3, en el que la etapa (3) se caracteriza por las etapas siguientes:
 - (a) fraccionamiento de las muestras que contienen rhMBL multimérico mediante la utilización de cromatografía de intercambio aniónico,
 - (b) preparación de una columna mediante empaquetamiento de sustrato al que se conjuga pre-S de virus de la hepatitis B,
 - (c) unión de la rhMBL a pre-S del virus de la hepatitis B específicamente mediante la adición de una muestra que contiene rhMBL a la columna en presencia de iones calcio, tras el equilibrado de la columna, y
 - (d) elución de las rhMBLs mediante la adición de una solución tampón suplementada con EDTA o EGTA de la columna en la que se había unido la rhMBL.
7. Método según la reivindicación 3, en el que la rhMBL es capaz de activar el sistema del complemento mediante la unión específica a una glucoproteína presente sobre la superficie de los microorganismos, en presencia de serina proteasa asociada a MBL, seleccionando dicha glucoproteína de entre un grupo que consiste de proteína pre-S de cubierta vírica glucosilada, proteína bacteriana glucosilada, proteína fúngica glucosilada y glucoproteína sintética.

FIG. 1

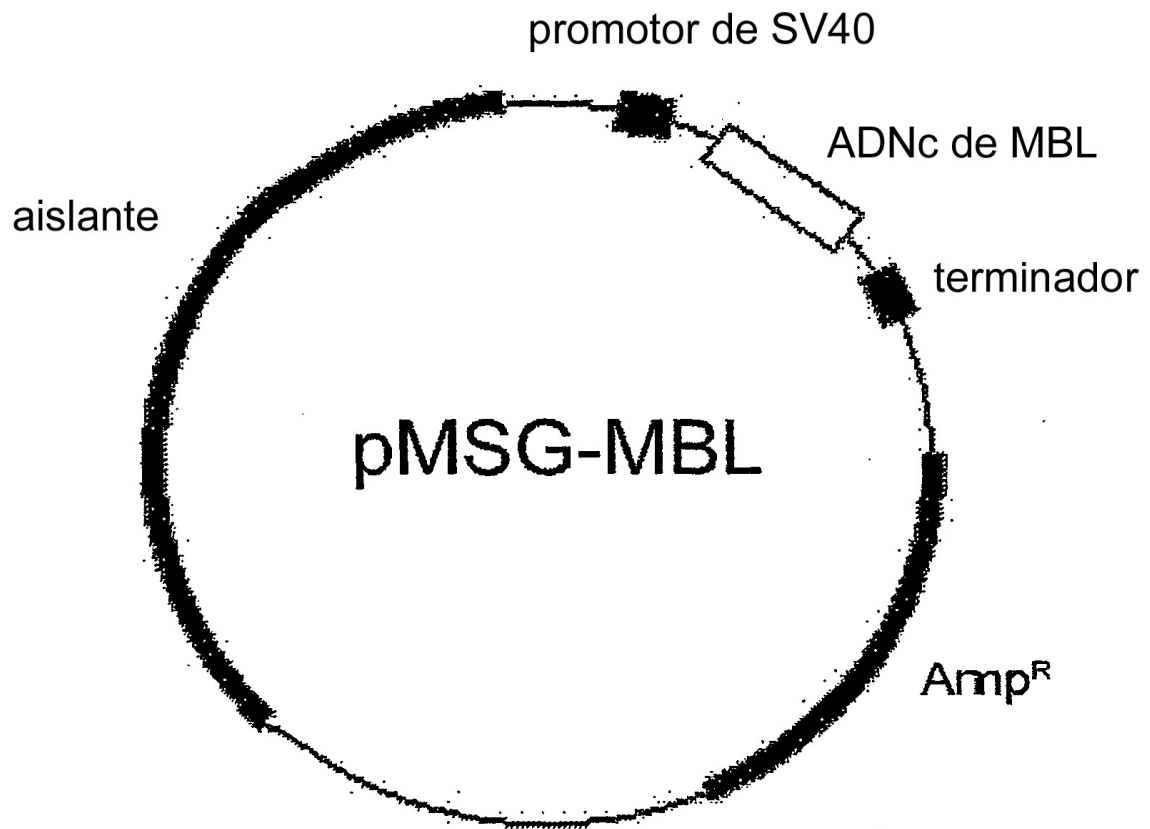


Fig. 1. Mapa genético del vector plásmido pMSG-MBL

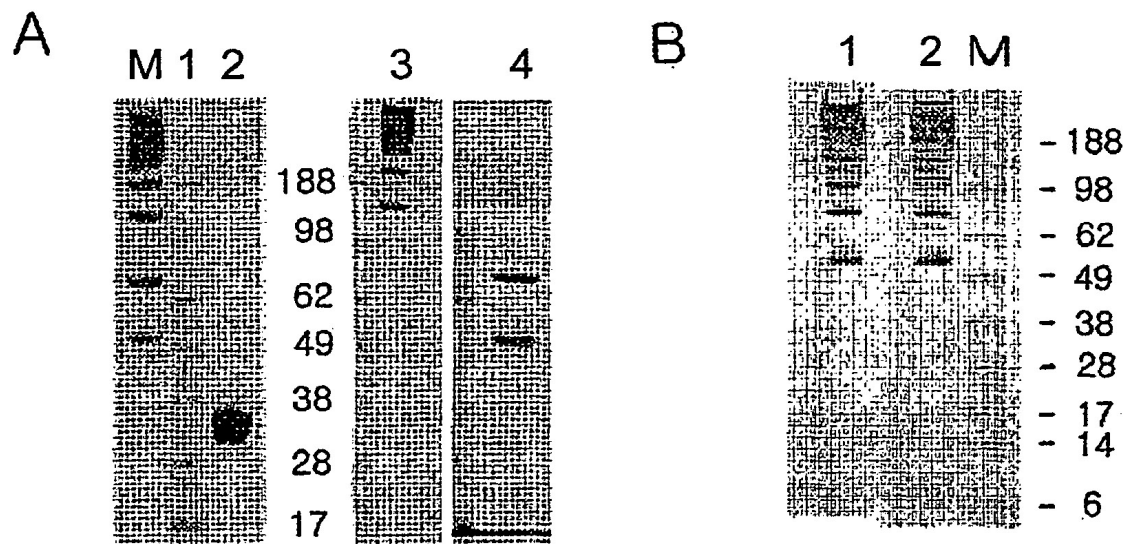
FIG. 2

Fig. 2. (A) Análisis SDS-PAGE de MBL purificada

carril 1: rhMBL purificada, condiciones no reductoras;
 carril 3: fracción de forma de mayor tamaño de rhMBL;
 carril 4: fracción de forma de menor tamaño de rhMBL;
 carril M: marcador de peso molecular

(B) Análisis de transferencia western de MBL purificada

carril 1: rhMBL purificada, condiciones no reductoras;
 carril 2: MBL natural parcialmente purificada
 a partir de plasma humano
 carril M: marcador de peso molecular

FIG. 3.

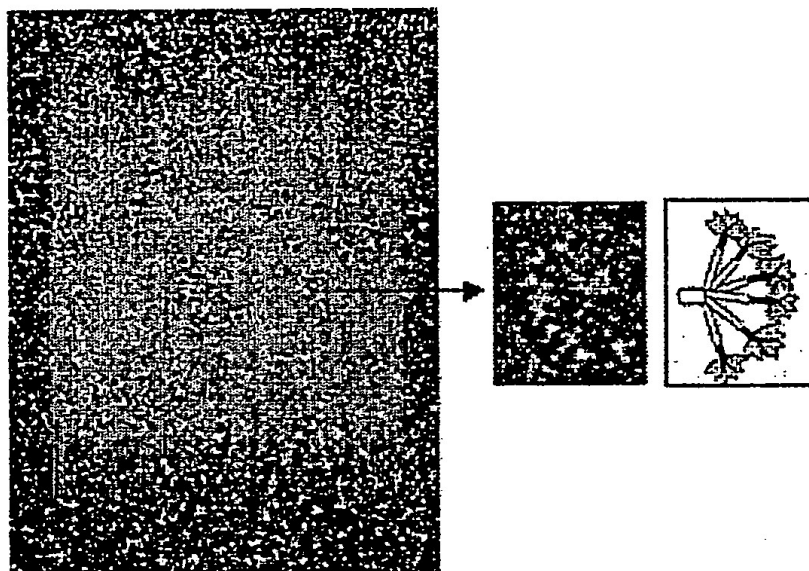


Fig. 3. Imagen de microscopía electrónica de rhMBL

Se observa la forma multimétrica de rhMBL con un microscopio electrónico de transmisión Tecnai 12

FIG. 4

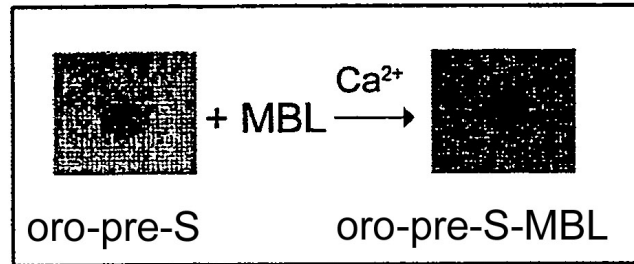


Fig. 4. Imagen de microscopía electrónica de rhMBL unida a pre-S-nanopartícula de oro

se observa rhMBL circundante a pre-S-nanopartícula de oro con un microscopio electrónico de transmisión Tecnai 12

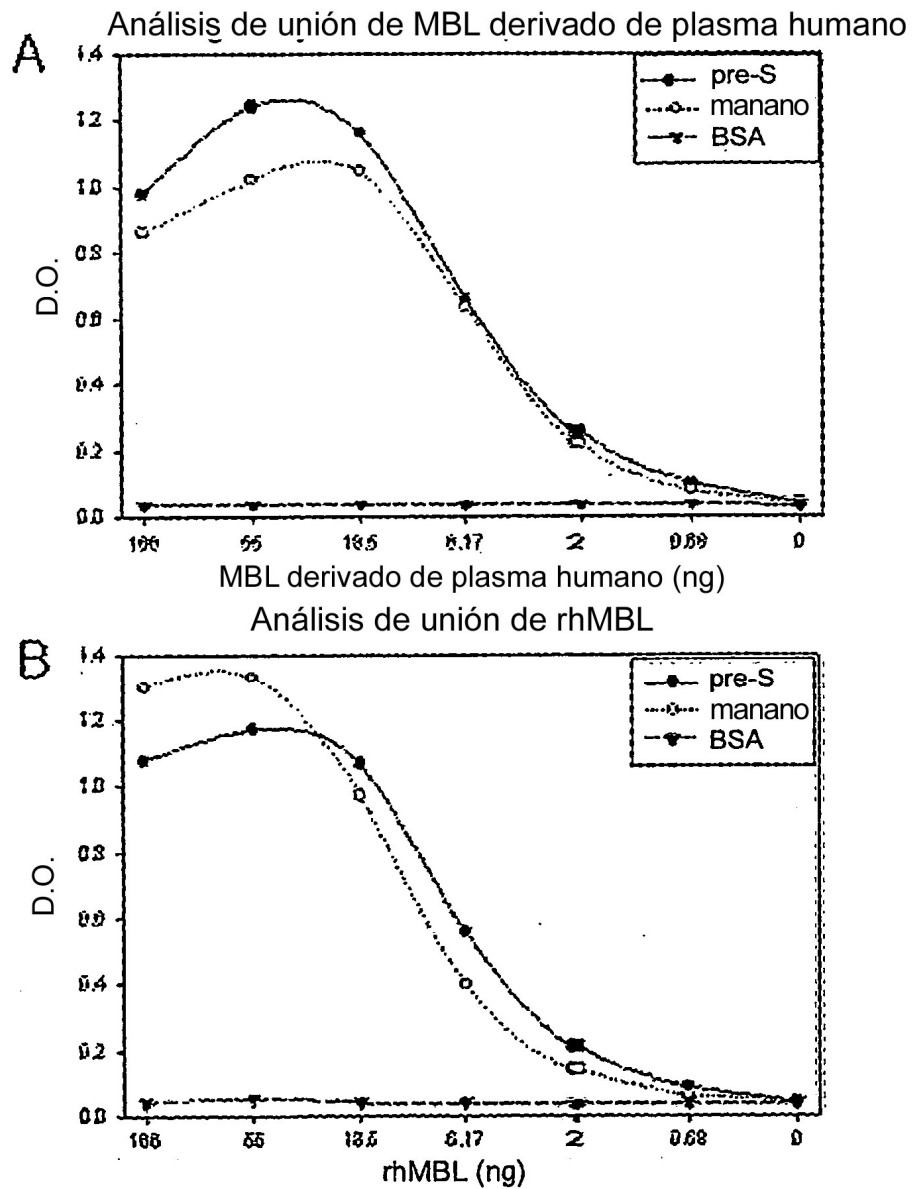
FIG. 5

Fig. 5. MBL unido a proteínas glucosiladas o a manano

A. MBL derivado de plasma humano

B. rhMBL

Ni MBL derivada de plasma humano ni la rhMBL unida a pre-S y a manano de modo dependiente de la concentración se unían a BSA

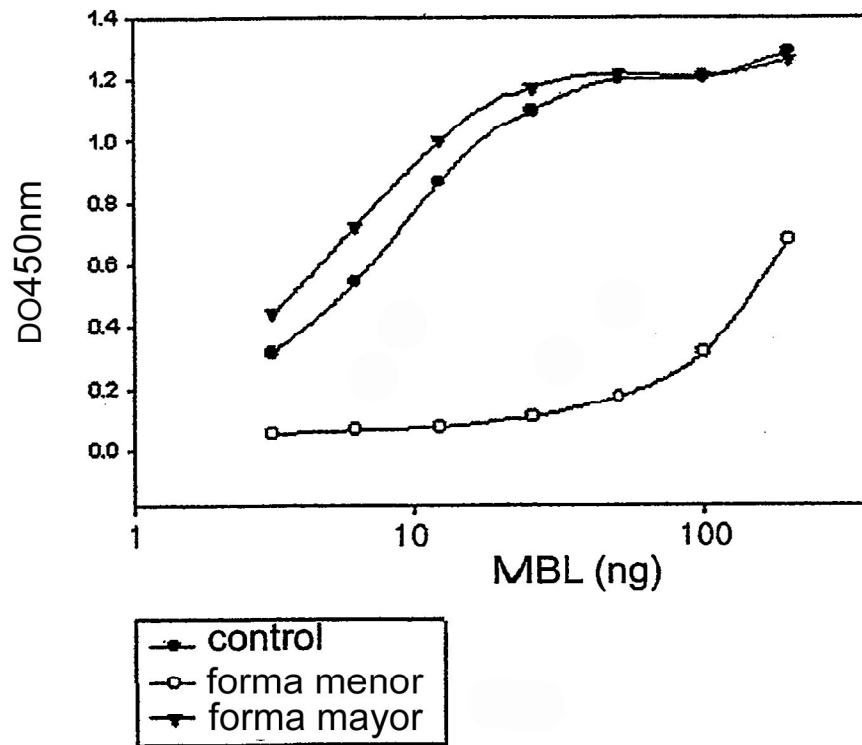
FIG. 6

Fig. 6. Análisis de unión de las formas de menor y mayor tamaño de rhMBL

Sólo la rhMBL de mayor tamaño mostró actividad de unión a pre-S correspondiente a la del control

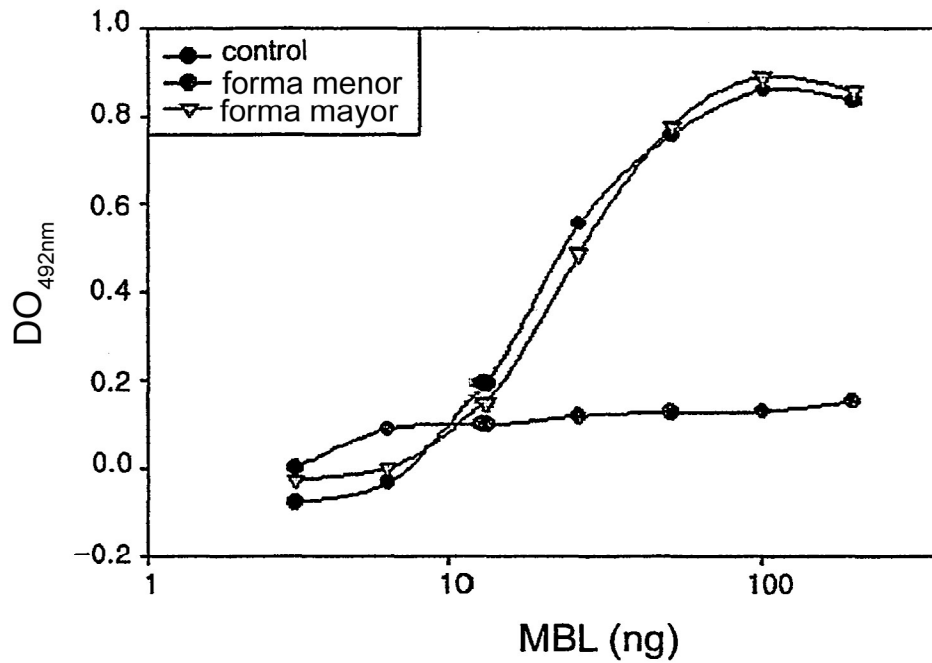
FIG. 7

Fig. 7. Análisis de activación de C4 utilizando las formas de menor y mayor tamaño de rhMBL

Sólo la forma de mayor tamaño de rhMBL indujo la activación de C4 al igual que el control, mientras que la forma de rhMBL de menor tamaño no lo hizo.

Se utilizó suero sin MBL como fuente de MASP

FIG. 8

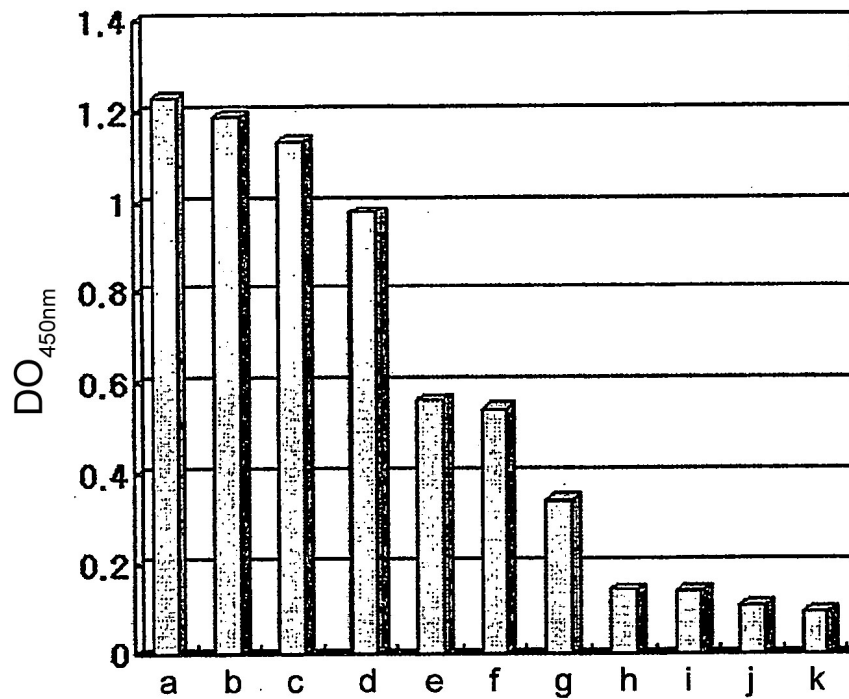
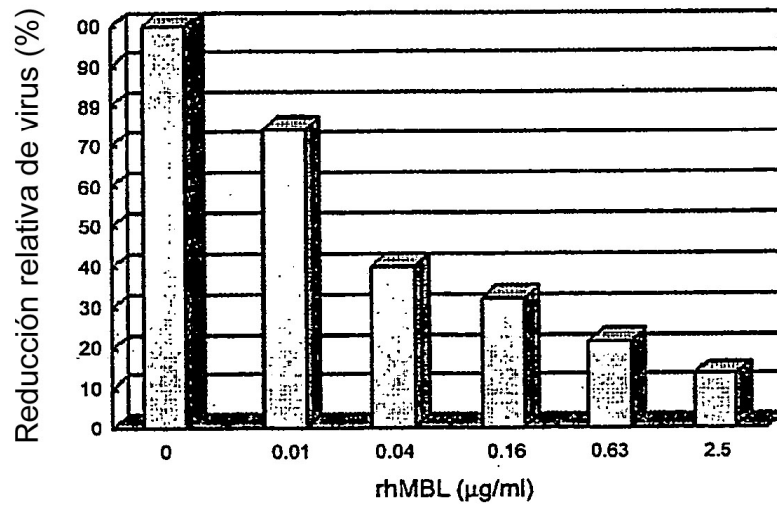


Fig. 8. Análisis de unión de rhMBL frente a diversos microorganismos

a: *C. albicans*b: *H. influenzae* ATCC51907c: *S. aureus* CCARM3197d: *S. aureus* ATCC29213e: *S. pyogenes* ATCC8668f: *S. aureus* CCARM3114g: *E. faecalis* ATCC29212h: *K. pneumoniae* ATCC10031i: *S. epidermidis* ATCC 12228j: *S. epidermidis* CCARM35048k: *E. faecium* CCARM5028

FIG. 9**Fig. 9. Inhibición de la infección por SARS-CoV utilizando rhMBL**

Al infectar las células FRhk-4 con SARS-CoV bajo condiciones de concentración exponencialmente creciente de rhMBL, la rhMBL en el medio inhibió las infecciones víricas hasta una proporción inferior al 15% del caso de infección sin rhMBL.

FIG. 10

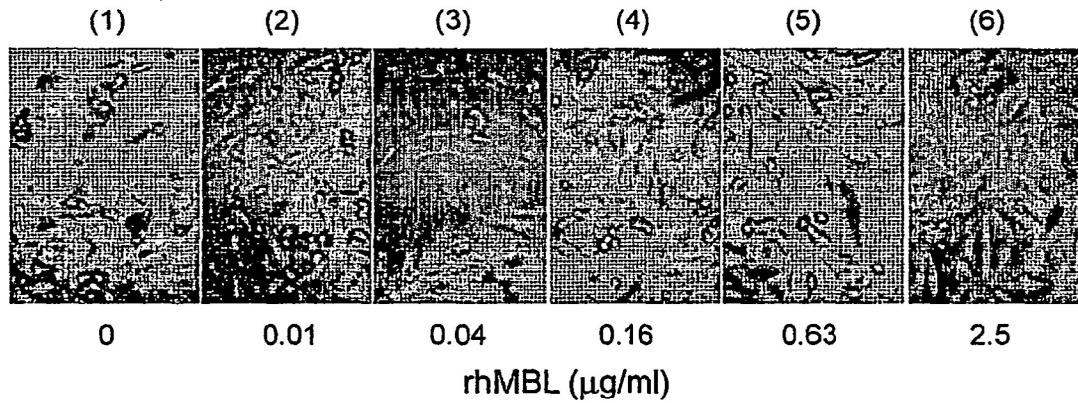


Fig. 10. Imagen de microscopía de contraste de fases de células FRhK-4 infectadas por SARS-CoV en una serie de tratamiento de concentraciones crecientes de rhMBL

Se observó un número creciente de células sanas al incrementar la concentración de rhMBL, mientras que en el tratamiento de no rhMBL se observaron células muertas e hinchadas