

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 143**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2011 PCT/US2011/021603**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2011 WO11090954**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2011 E 11735056 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2526119**

54 Título: **Opsonina obtenida por ingeniería genética para la detección y el tratamiento de microorganismos patógenos**

30 Prioridad:

19.01.2010 US 296222 P

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

09.08.2018

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE (100.0%)
17 Quincy Street
Cambridge, MA 02138, US**

72 Inventor/es:

**SUPER, MICHAEL;
WAY, JEFFREY, CHARLES y
INGBER, DONALD E.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 678 143 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

Opsonina obtenida por ingeniería genética para la detección y el tratamiento de microorganismos patógenos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a inmunología molecular, microbios patógenos, y sistemas para detectar y/o eliminar microorganismos patógenos en fluidos, incluyendo fluidos corporales tales como sangre. Más específicamente, por ejemplo, la presente invención proporciona una opsonina molecular obtenida por ingeniería genética que se puede usar para unirse a microorganismos patógenos biológicos o identificar subclases o especies específicas de microorganismos patógenos para su uso en dispositivos y sistemas para el tratamiento y diagnóstico de pacientes con enfermedades infecciosas, enfermedades de transmisión sanguínea, o sepsis.

15 **Antecedentes**

En los Estados Unidos de América, la sepsis es la segunda causa principal de muerte en los pacientes de UCI no coronaria, y la décima causa más común de muerte general. La sepsis es una afección médica grave que se caracteriza por un estado inflamatorio corporal completo (denominado síndrome de respuesta inflamatoria sistémica) y la presencia de una infección conocida o sospechada. Por lo general, la sepsis se produce durante bacteremia, viremia o fungemia, y puede ser el resultado de infecciones que están causadas por microorganismos patógenos, tales como *Staphylococcus aureus*, que no son microorganismos patógenos de transmisión sanguínea habituales. Los microorganismos patógenos de transmisión sanguínea son microorganismos que causan una enfermedad cuando se transfieren desde una persona infectada a otra persona a través de la sangre u otros fluidos corporales potencialmente infectados. Las enfermedades más comunes incluyen hepatitis B, virus de la inmunodeficiencia humana, malaria, hepatitis C, y sífilis.

Desafortunadamente, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica se puede volver mortal antes de que se haya identificado el agente de la infección mediante un cultivo sanguíneo. Esta respuesta inmunológica causa una activación extendida de proteínas de fase aguda, que afecta al sistema de complemento y a las rutas de coagulación, que a continuación causan daños tanto en la vasculatura como en los órganos. También se activan diversos sistemas contrarreguladores neuroendocrinos, agravando a menudo el problema. Incluso con un tratamiento inmediato y agresivo, esto puede progresar a síndrome de disfunción orgánica múltiple y finalmente la muerte. Por lo tanto, existe la necesidad de técnicas mejoradas para el diagnóstico y el tratamiento de pacientes con enfermedades infecciosas, infecciones de transmisión sanguínea, sepsis, o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. El documento de Patente WO03/054164A2 desvela polinucleótidos de lectina de tipo C y métodos de preparación y el uso de los mismos. El documento de Patente WO04/018698A2 desvela composiciones de lectina y métodos para modular una respuesta inmune. El documento de Patente WO09/126346A2 desvela métodos para prevenir y tratar infecciones con lectina de unión a manano y proteínas de fusión ficol-MBL. El documento de Patente WO09/062195A2 desvela proteínas de fusión de lectinas de unión a manosa para el tratamiento de enfermedades. El documento de Patente US2008/0193965A1 desvela la detección y el análisis de microorganismos usando reconocimiento de carbohidrato y lectinas.

40 **Sumario**

La presente invención proporciona una proteína de fusión de opsonina molecular obtenida por ingeniería genética que se define mediante las reivindicaciones que se puede usar para unirse a microorganismos patógenos biológicos o identificar subclases o especies específicas de microorganismos patógenos para su uso en dispositivos y sistemas para el tratamiento y el diagnóstico de pacientes con enfermedades infecciosas, infecciones de transmisión sanguínea o sepsis; o en la identificación de microorganismos patógenos que se transmiten por el agua o la comida. La presente divulgación proporciona una lectina de unión a manosa (MBL), que es una proteína del suero natural abundante que es parte del sistema inmune innato. La capacidad esta proteína lectina para unirse a las moléculas superficiales de casi todas las clases de biopatógenos (virus, bacterias, hongos, protozoos) hace las formas obtenidas por ingeniería de MBL extremadamente útiles en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades infecciosas y sepsis.

Una realización de la presente divulgación proporciona una opsonina recombinante que comprende un dominio de reconocimiento de carbohidrato de una opsonina, un dominio de unión a sustrato, y un dominio de péptido flexible que une el dominio de reconocimiento al dominio de unión a superficie sólida. En aspectos de la divulgación, el dominio de reconocimiento de carbohidrato es una lectina o un fragmento de una lectina. Alternativamente, el dominio de reconocimiento de carbohidrato es una colectina o ficolina, o una parte o fragmento de estas. En un aspecto particular, el dominio de reconocimiento de carbohidrato (CRD) comprende una parte de MBL que comienza en el resto de prolina 81 en el extremo N-terminal de la parte de lectina de la opsonina obtenida por ingeniería genética. En otro aspecto particular, el dominio de reconocimiento de carbohidrato comprende la parte de MBL que comienza en el resto de glicina 111 en el extremo N-terminal de la parte de lectina de la opsonina obtenida por ingeniería genética.

En un aspecto particular de la divulgación, el dominio de unión a sustrato de la opsonina recombinante comprende uno o más restos de cisteína que permiten la reticulación química a un sustrato sólido. El sustrato sólido puede comprender una microperla magnética (que puede estar revestida con proteína A), una membrana microporosa, un reactor de fibra hueca, o cualquier otra membrana u dispositivo de flujo de filtración sanguínea. En otros aspectos, el sustrato puede ser la superficie de células, tales como células inmunes (por ejemplo, macrófagos), las superficies de células que revisten los tejidos u órganos del sistema inmune (por ejemplo, ganglios linfáticos o bazo), o la superficie de la matriz extracelular de tejidos u órganos del sistema inmune.

En otro aspecto de la divulgación, el dominio de péptido flexible puede comprender al menos un segmento Glicina + Serina y/o al menos un segmento Prolina + Alanina + Serina. En otro aspecto de la presente invención, el conector flexible es una porción Fc de una inmunoglobulina, tal como Fc γ . La fusión de Fc IgG1 humana al cuello y las regiones CRD de MBL mejora la expresión y la purificación y el acoplamiento a un sustrato en una forma activa.

Una realización de la invención proporciona un método de recogida de un microorganismo de unión a opsonina de un fluido que comprende poner en contacto el fluido con una proteína de fusión de opsonina recombinante que se define mediante las reivindicaciones, conjugada a una superficie sólida; en el que la opsonina recombinante consiste en un dominio de reconocimiento de carbohidrato de una opsonina, un dominio de unión a sustrato sólido, y un dominio de péptido flexible que une el dominio de reconocimiento al dominio de unión a superficie sólida; permitir que el microorganismo de unión a opsonina se una a dicho conjugado opsonina recombinante-superficie sólida; y separar dicho fluido de dicho conjugado opsonina recombinante unida a microorganismo-superficie sólida. El fluido puede ser un fluido biológico, tal como sangre, obtenido de un sujeto. El fluido se puede devolver a continuación al sujeto.

Otra realización de la divulgación proporciona un método de tratamiento de una infección sanguínea en un sujeto que comprende administrar una opsonina recombinante a la sangre del sujeto, en el que la opsonina recombinante consiste en un dominio de reconocimiento de carbohidrato de una opsonina, un dominio de unión a sustrato, y un dominio de péptido flexible que une el dominio de reconocimiento al dominio de unión a sustrato, en el que el dominio de reconocimiento de carbohidrato se une a un microorganismo de unión a opsonina, y en el que el dominio de unión a sustrato se une a una célula, tejido u órgano del sistema inmune; permitir que la opsonina recombinante se una al microorganismo de unión a opsonina; y permitir que la opsonina recombinante unida al microorganismo se una a una célula, tejido u órgano del sistema inmune en el que se elimina el microorganismo. El sujeto puede ser un animal o un ser humano.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un diagrama de lectina de unión a manosa (MBL) obtenida por ingeniería genética en conjuntos de trímeros (polímeros) en una realización de la presente invención.

Las Figuras 2A y 2B son diagramas de una realización de la presente invención en la que una proteína artificial (Figura 2A) que comprende un extremo N-terminal no impedido estéricamente (opcionalmente con una cisteína en o cerca del extremo N-terminal), seguido por un segmento largo y flexible de péptido, y a continuación un dominio de lectina MBL en el extremo C-terminal, está reticulada a un sustrato sólido en el dispositivo a modo de ejemplo en la Figura 2B.

La Figura 3 muestra un diagrama de una realización de la invención, Fc-MBL.81, tanto en una viñeta como en forma de modelo basado en los modelos de cristalografía de rayos X de Fc y del cuello y los dominios de reconocimiento de carbohidrato (CRD) de MBL.

La Figura 4 es un esquema de un vector que codifica Fc en un aspecto de la invención.

La Figura 5 muestra la unión dependiente de calcio de Dynabead-MBL a *C. albicans* en la que el calcio mantiene la unión y el AEDT a desestabiliza la unión.

La Figura 6 muestra la unión de MBL-perlas magnéticas a diferentes patógenos. Los patógenos se unieron mediante MPL-perlas magnéticas revestidas (control: perlas sin MBL), se lavaron, y se eluyeron sobre placas de cultivo.

La Figura 7 muestra datos de unión de MBL-perlas magnéticas a microorganismos y ensayo de cultivo durante una noche. Los patógenos se unieron mediante MBL-perlas magnéticas revestidas (control: perlas sin MBL), se lavaron, y se eluyeron sobre placas de cultivo y se incubaron durante una noche.

La Figura 8 demuestra altos niveles de expresión de FcMBL de transfección transitoria. La Figura 8A es una transferencia de Western de un gel reducido cargado con sobrenadante sin purificar de 293 células transfectado con pFUSEFc MBL.81 (y pFUSE Fc) y con sonda de anti-hFc. La Figura 8B muestra Proteína A-FcMBL.81 purificada.

La Figura 9 muestra resultados de un ensayo de agotamiento en el que la construcción FcMBL.81 fue tan activa como MBL de longitud completa en unión a *C. albicans*.

Descripción detallada

Se ha de entender que la presente invención no se limita a la metodología particular, protocolos, y reactivos, etc., que se describen en el presente documento y como tales pueden variar. La terminología que se usa en el presente documento es con el fin de describir únicamente realizaciones particulares, y no se pretende que limite el ámbito de

la presente invención, que se define únicamente mediante las reivindicaciones.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, las formas en singular incluyen la referencia en plural y viceversa a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. A diferencia de los ejemplos operativos, o cuando se indique de otro modo, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción que se usan en el presente documento se debería entender que están modificados en todos los casos con el término "aproximadamente".

Todos los documentos de patente y otras publicaciones identificadas se incorporan expresamente en el presente documento por referencia con el fin de describir y desvelar, por ejemplo, las metodologías que se describen en tales publicaciones que se pudieran usar junto con la presente invención. Estas publicaciones se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. No se debería interpretar nada a este respecto como la admisión de que los inventores están facultados para antedatar tal divulgación en virtud de invención anterior o por cualquier otra razón. Todas las declaraciones en lo que se refiere a la fecha o la representación en lo que se refiere a los contenidos de estos documentos se basan en la información disponible para los solicitantes y no constituye ninguna admisión en lo que se refiere a la corrección de las fechas o los contenidos de estos documentos.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende de forma habitual el experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque se puede usar cualquier método, dispositivo, y material conocido en la práctica o en el ensayo de la invención, en el presente documento se describen los métodos, dispositivos, y materiales a este respecto.

En el sentido más amplio, las opsoninas son proteínas que se unen a la superficie de una partícula. En la naturaleza, las opsoninas actúan como mejoradores de unión para el proceso de fagocitosis, por ejemplo, mediante el revestimiento de las moléculas con carga negativa sobre una membrana de un patógeno diana. La presente invención proporciona una opsonina molecular obtenida por ingeniería genética, tal como lectina de unión a manosa (MBL), que se puede usar para unir patógenos biológicos o identificar subclases o especies específicas de patógenos para su uso en dispositivos y sistemas para el tratamiento y el diagnóstico de pacientes con enfermedades infecciosas, infecciones de transmisión sanguínea o sepsis. El tratamiento se puede llevar a cabo *in vivo* o *ex vivo*.

MBL es una opsonina de lectina de suero que se une a manosa, carbohidratos que contienen N-acetilglucosamina (NAG), y otros carbohidratos diversos que están presentes en la superficie de numerosos patógenos microbianos. MBL (también denominada proteína de unión a manosa o manano, MBP) es una proteína polimérica ensamblada a partir de tres o más monómeros de 32 kDa. Cada monómero tiene una región N-terminal rica en cisteína, una región gly-X-Y de tipo colágeno, una región de cuello y un dominio de reconocimiento de carbohidrato. El ensamblaje de los polímeros de mayor peso molecular (MW) comienza con la formación de trímeros del monómero de 32 kDa; estos trímeros se autoensamblan a continuación en polímeros de mayor MW de tres a seis conjuntos de trímeros. Véase la Figura 1.

MBL es un componente clave en la opsonización de patógenos microbianos y en la activación del complemento (a través de la ruta de la lectina) y la coagulación. La opsonización es la unión de proteínas a células diana y la fijación como diana de estas células para la captación y destrucción por parte de células fagocíticas, tales como macrófagos y neutrófilos. Esta opsonización parece estar mediada por el dominio N-terminal rico en cisteína pequeño de MBL así como C3b depositado en la superficie de las células diana mediante la activación de la ruta del complemento de la lectina mediada por MBL.

En la activación del complemento a través de la ruta de la lectina, el microbio y proteínas especializadas, es decir, MASP-1 (serina proteasa asociada a lectina de unión a manano) (Matsushita & Fujita, 176 J. Exp. Med. 1497 (1992)), y MASP-2 (Thiel *et al.*, 386 Nat. 506 (1997)), interactúan con la MBL unida y activan el complemento en ausencia de anticuerpos. Los complejos de MBL de mayor peso molecular (de 5 a 6 repeticiones del trímero de MBL funcional) son potentes activadores del complemento a través de esta ruta de la lectina, en la que MASP 2 parece activar el complemento, y MASP 1 activa la coagulación. Los complejos menores (de tres a cuatro repeticiones de la unidad de trímero de MBL) son los activadores más potentes de la coagulación. Krarup *et al.*, 2 PLoS One e623 (2007).

En ciertas poblaciones humanas, existe una alta frecuencia alélica de mutaciones en MBL en la hélice de colágeno, en los codones 52, 54, y 57. Garred *et al.*, 7 Genes Immun. 85 (2006). Estas mutaciones evitan la formación de las formas de MBL de mayor peso molecular y suprimen la activación del complemento. En estos casos, MBL aún funciona como una opsonina y estimula la coagulación, pero sin la activación del complemento. También existen algunas evidencias de una ventaja heterocigótica con respecto a la sepsis, en la que los heterocigotos tienen la mejor supervivencia, los homocigotos "de tipo salvaje" la segunda mejor, y los homocigotos "mutantes" tienen la peor supervivencia. Véase Sprang *et al.*, 49 Clin. Infect Dis. 1380 (2009). Además, los neonatos homocigotos mutantes son particularmente susceptibles a la infección antes de que el sistema inmune adquirido comience a

funcionar.

Ha habido mucho debate con respecto a la utilidad de MBL como proteína terapéutica recombinante para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Se ha usado MBL intacta en ensayos clínicos en fase 1 y fase 2, tanto como proteína recombinante como cuando se purifica a partir de donaciones de sangre humana. De hecho, se ha usado MBL obtenida a partir de plasma como agente terapéutico en ensayos en fase 1 y fase II de pacientes pediátricos deficientes en MBL con neutropenia inducida por quimioterapia. Frakking *et al.*, 45 Eur. J. Cancer 50 (2009). Los esfuerzos comerciales por desarrollar MBL han fracasado debido a las dificultades tanto en la producción de la proteína recombinante como en la eficacia de estabilización. Como se usa en el presente documento, tratamiento o tratar a un sujeto se puede referir a los cuidados médicos que se proporcionan para controlar, mejorar, o aliviar una enfermedad, afección, o los síntomas de las mismas.

La presente invención proporciona opsoninas obtenidas por ingeniería genética, por ejemplo, MBL o polímeros MBL obtenidos por ingeniería genética, para su uso en dispositivos y sistemas para la detección y eliminación de microorganismos patógenos. La Figura 5 muestra la unión dependiente de calcio de microperlas magnéticas conjugadas con MBL a la levadura *C. albicans*. Las Figuras 6 y 7 comparan la unión de MBL-perla magnética entre varios patógenos diferentes, incluyendo la bacteria grampositiva *S. aureus*; las bacterias gramnegativas *Klebsiella* y *E. coli*; y la levadura *C. albicans*. Los trabajos recientes han demostrado la viabilidad del uso de técnicas micromagnéticas y microfluidas combinadas para eliminar microorganismos patógenos vivos de fluidos circulantes, tales como fluidos biológicos, tales como sangre. Xia *et al.*, 8 Biomed. Dev. Biomed. Microdev. 299 (2006); Yung *et al.*, Lab on a Chip DOI: 10.1039/b816986a (2009). En estos microdispositivos (microperlas magnéticas que están revestidas con moléculas que se unen de forma específica a marcadores superficiales en las células de microorganismos patógenos), se permite que se unan a estas células en sangre humana completa, y a continuación se extraen exentas de la sangre que fluye a través de canales microfluidos usando un gradiente de campo magnético aplicado. Véanse los documentos de Patente WO/2008/130618; WO/2007/044642.

Entre otros usos, estos dispositivos son una gran promesa para limpiar con rapidez la sangre de pacientes sépticos de microorganismos patógenos que producen toxinas, y por lo tanto aumentan en gran medida la respuesta a las terapias antibióticas convencionales. La capacidad de unirse, detectar y aislar con rapidez (en minutos) microorganismos patógenos vivos que circulan en la sangre, o presentes en otros fluidos biológicos, usando un microdispositivo potencialmente barato y fácil de usar también sortea las limitaciones principales de los ensayos de detección y de prueba de sensibilidad de microorganismos patógenos actuales que requieren múltiples días de cultivo microbiano en los hospitales o los laboratorios comerciales.

Los fluidos biológicos que se pueden usar en la presente invención incluyen, por ejemplo, sangre, líquido cefalorraquídeo, fluido articular, orina, semen, saliva, lágrimas, y fluidos que se recogen por inserción de una aguja. Además, se pueden recoger fluidos de muestras de alimentos o agua para ensayos de contaminación generales y rápidos de acuerdo con la presente invención: tal fluido se puede recoger y analizar para contaminación microbiana natural o para posible contaminación por "bioterrorismo".

Además, la eficacia actual de estos métodos aprovecha el conocimiento de la técnica anterior de microorganismos patógenos específicos que se desea eliminar de la sangre, debido a que se sitúa un ligando específico para ese patógeno (por ejemplo, un anticuerpo específico) sobre las microperlas magnéticas antes de usar el dispositivo de limpieza de la sangre. De ese modo, la presente invención refuerza los enfoques actuales mediante la provisión de moléculas de unión genéricas obtenidas por ingeniería genética que funcionan como opsoninas biológicas y se unen a muchos o la totalidad de tipos específicos de patógenos microbianos según requiera la aplicación. A este respecto, la presente invención tiene aplicaciones terapéuticas.

Otra necesidad que se aborda en el presente documento es el desarrollo de opsoninas específicas de clase de microorganismo patógeno especializadas que se unen, por ejemplo, a la totalidad de los tipos de hongos o a la totalidad de las bacterias gramnegativas o a la totalidad o a bacterias grampositivas específicas o a la totalidad de los virus o a la totalidad de los protozoos, dado que este conocimiento podría aconsejar con rapidez a los médicos en su selección de terapias antimicrobianas antes de que se identifique la caracterización completa del tipo de especie de sensibilidad antibiótica con los métodos convencionales que a menudo requieren muchos días para completarse.

Además, con el uso de la ingeniería genética, y las estrategias de evolución y selección dirigidas, se pueden obtener por ingeniería genética versiones modificadas de opsoninas naturales, tales como MBL, que se unen a microorganismos patógenos de forma específica a la especie. Finalmente, se puede conseguir una unión que sea específica para una sensibilidad de microorganismo patógeno a diferentes antibióticos o sustancias terapéuticas antimicrobianas usando estrategias de selección apropiadas. Por lo tanto, la presente invención proporciona el desarrollo de opsoninas obtenidas por ingeniería genética que proporcionan estas propiedades de alto valor.

MBL es una excelente selección para su uso como opsonina genérica para los fines que se describen en el presente documento; sin embargo, por lo general, la molécula intacta no se usa en presencia de la sangre completa debido a que tiene múltiples dominios funcionales que estimulan la coagulación sanguínea que pueden interferir con la

función diagnóstica y terapéutica del microdispositivo. Esta característica de MBL se puede separar de su función de unión a microorganismo patógeno como se proporciona en el presente documento. De forma más específica, MBL contiene cuatro partes, de extremo N-terminal a C-terminal: un dominio N-terminal pequeño de función básicamente desconocida que puede estar implicado en la unión a macrófagos y/o la unión a MASP; un segmento de colágeno que también puede estar implicado en la unión a MASP y la oligomerización de orden superior; un segmento de "cuello" alfa-helicoidal que es suficiente para la trimerización; y el dominio de lectina de CRD en el extremo C-terminal que media la unión directa al microorganismo patógeno. El dominio de lectina es útil para la aplicación manual, y los demás dominios pueden estar presentes o ser eliminados dependiendo de las necesidades del usuario, y se puede determinar mediante ensayo de rutina. Además, la actividad de lectina es dependiente de calcio, de modo que los microbios unidos se podrían liberar mediante un agente quelante con fines diagnósticos.

Una realización de una configuración obtenida por ingeniería genética de MBL, útil como opsonina genérica para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, comprende el dominio de lectina de MBL. Por ejemplo, la Glicina 111 (como se define en el Colaboratorio de Investigación para la Bioinformática Estructural, *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB), archivo estructural 1HUP del Banco de Datos de Proteínas, *Protein Data Bank*) es un punto N-terminal conveniente en el que comenzar la parte de lectina de la opsonina obtenida por ingeniería genética. Debido a que la unión de MBL a un azúcar monomérico dado es débil, la MBL se puede unir a la matriz sólida de una forma flexible de un modo tal que las proteínas sobre la superficie se puedan mover y ajustar a la forma del microbio. Por ejemplo, se puede situar un péptido flexible, tal como uno o más segmentos de Glicina + Serina o uno o más segmentos de Prolina + Alanina + Serina, u otro u otros conectores peptídicos conocidos en la técnica, en el extremo N-terminal de MBL, como en la Figura 2A, debido a que estos segmentos tienden a no formar estructuras dobladas.

Otra realización de una configuración obtenida por ingeniería genética de MBL, útil como opsonina genérica para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, comprende el cuello y los dominios de lectina de MBL. La Prolina 81 (como se define en el archivo estructural 1HUP del Colaboratorio de Investigación para la Bioinformática Estructural, Banco de Datos de Proteínas, (RCSB PDB)) es un punto N-terminal conveniente en el que empezar la secuencia de la lectina para esta construcción de opsonina obtenida por ingeniería genética. Esta parte de MBL se condensa corriente abajo (C-terminal) a la porción Fc de IgG humana (Fcy). La porción Fc puede incluir la interfase CH2-CH3 del dominio Fc de IgG, que contiene los sitios de unión para un cierto número de receptores de Fc que incluyen la proteína A estafilocócica. En uso, la porción Fc se dimeriza y refuerza la afinidad de avidez de la unión mediante lectinas MBL a azúcares monoméricos. Además, cuando se usa como reactivo de diagnóstico, se puede retirar la glucosilación unida a N de la opsonina recombinante. Por ejemplo, en Fc MBL.81 la glucosilación se puede retirar mediante el cambio del aminoácido en el resto 297 de asparagina a ácido aspártico (N297D) en el sistema de Kabat de numeración de aminoácidos en anticuerpos, este corresponde al aminoácido 82 en esta construcción de Fc particular. Fc glucosilado mantiene la orientación correcta para la citotoxicidad mediada por células (ADCC) y la citotoxicidad mediada por complemento (CDC) dependientes de anticuerpos mediados por Fc.

La opsonina Fc MBL obtenida por ingeniería genética se podría usar en la activación de la captación mediada por receptores de Fc de *Mycobacterium tuberculosis* opsonizado con Fc MBL, evitando la captación mediada por receptores de manosa de *M. tuberculosis*. Las publicaciones recientes (Kang *et al.*, 202 J. Exp. Med. 987 (2005)), sugieren que el lipoarabinomano (ManLaM) de la superficie de las células de *M. tuberculosis* se acopla al receptor de manosa de los macrófagos (MMR) durante el proceso de fagocitosis. Esto dirige al *M. tuberculosis* a su nicho fagosómico inicial e inhibe la fusión fagosoma-lisosoma (P-L), potenciando de ese modo la supervivencia en los macrófagos humanos. De forma interesante, la inhibición de la fusión P-L no se produjo con la entrada a través de receptores Fcy. En una realización, la captación mediante endocitosis del receptor de Fc dirige la bacteria (por ejemplo *M. tuberculosis*, a diferentes vesículas intracelulares.

La configuración de la opsonina obtenida por ingeniería genética de la presente invención también contribuye a la unión de la proteína de fusión a un sustrato, tal como una superficie sólida de una microperla magnética o una membrana microporosa, mediante el uso de un reticulador químico que es específico para el grupo amino en el extremo N-terminal, o a un resto de cisteína libre que se ha obtenido por ingeniería genética para que esté cerca del extremo N-terminal de la proteína, como en la Figura 2B (la lisina es una alternativa a la cisteína, seguido opcionalmente de la retirada del resto de los restos de lisina de la proteína).

En algunas realizaciones, el sustrato al que se une la opsonina es una célula viva o la matriz extracelular de un tejido u órgano. Por ejemplo, el sustrato puede ser la superficie de una célula, tejido u órgano asociado a la respuesta inmune. Por ejemplo, la célula puede ser un fagocito (macrófago, neutrófilo, y célula dendrítica), mastocito, eosinófilo, basófilo, y/o linfocito citolítico natural. La célula puede ser una célula de los tejidos u órganos del sistema inmune, tales como bazo, ganglios linfáticos, vasos linfáticos, amígdalas, timo, médula ósea, placas de Peyer, tejidos conectivos, membranas mucosas, el sistema reticuloendotelial, etc. La superficie a la que se une la opsonina también puede ser la matriz extracelular de uno o más de estos tejidos u órganos.

En algunas realizaciones, el sustrato sólido puede comprender perlas magnéticas u otros materiales con estructura, que a continuación extraen los microbios de los fluidos, incluyendo fluidos biológicos tales como sangre, y concentran y recogen los microbios, incluyendo los microbios vivos. Este enfoque es ventajoso debido a que las

perlas se pueden examinar a continuación para la presencia del microbio, o se pueden usar para transferir los microbios recogidos a un cultivo de microorganismos patógenos convencional y ensayos de prueba de sensibilidad. En otras palabras, la opsonina obtenida por ingeniería genética se puede usar en diagnóstico como medio de recogida de microorganismos patógenos potenciales para identificación; no solo en el diagnóstico de enfermedades, sino también en la identificación de microorganismos patógenos, materiales formados por partículas u otros contaminantes que se transmiten por el agua o los alimentos. Alternativamente, el sustrato sólido puede comprender un reactor de fibra hueca o cualquier otra membrana o dispositivo de flujo de filtración de sangre (por ejemplo, un tubo de diálisis sencillo) u otras resinas, fibras, o láminas que se unan selectivamente a y secuestren los microorganismos patógenos biológicos.

Las perlas magnéticas pueden ser de cualquier forma que incluye, pero no se limita a, esférica, varilla, elíptica, cilíndrica, disco, y similares. En algunas realizaciones, se usan perlas magnéticas que tienen una verdadera forma cilíndrica y una química superficial definida para minimizar la aglutinación química y la unión no específica. Como se usa en el presente documento, la expresión "perlas magnéticas" se refiere a una partícula a nano o microescala que es atraída o repelida por un gradiente de campo magnético o tiene una susceptibilidad magnética que no es cero. La perla magnética puede ser paramagnética o superparamagnética. En algunas realizaciones, las perlas magnéticas son superparamagnéticas. Las perlas magnéticas también se denominan partículas magnéticas en el presente documento. En algunas realizaciones, se usan perlas magnéticas que tienen una corteza de polímero para proteger el microorganismo de la exposición al hierro. Por ejemplo, se pueden usar perlas magnéticas revestidas con polímero para proteger a los microorganismos patógenos de la exposición al hierro.

Las perlas magnéticas pueden variar en tamaño de 1 nm a 1 mm. Por ejemplo, las perlas magnéticas tienen un tamaño de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 250 μm . En algunas realizaciones, la perla magnética tiene un tamaño de 0,1 μm a 100 μm . En algunas realizaciones, la perla magnética tiene un tamaño de 0,1 μm a 50 μm . En algunas realizaciones, la perla magnética tiene un tamaño de 0,1 μm a 10 μm . En algunas realizaciones, la perla magnética es una nanopartícula magnética o una micropartícula magnética. Las nanopartículas magnéticas son una clase de nanopartículas que se pueden manipular usando un campo magnético o un gradiente de campo magnético. Tales partículas consisten habitualmente en elementos magnéticos tales como hierro, níquel y cobalto y sus compuestos químicos. Las nanopartículas magnéticas se conocen bien y se han descrito métodos para su preparación en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos n.º 6.878.445; n.º 5.543.158; n.º 5.578.325; n.º 6.676.729; n.º 6.045.925; y n.º 7.462.446; y los documentos de Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2005/0025971; n.º 2005/0200438; n.º 2005/0201941; n.º 2005/0271745; n.º 2006/0228551; n.º 2006/0233712; n.º 2007/01666232; y n.º 2007/0264199.

Las perlas magnéticas se pueden encontrar fácil y ampliamente en el mercado, con o sin grupos funcionales capaces de unirse a moléculas de afinidad. Están disponibles en el mercado perlas magnéticas adecuadas tal como en Dynal Inc. (Lake Success, NY); PerSeptive Diagnostics, Inc. (Cambridge, MA); Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA); Cortex Biochem Inc. (San Leandro, CA); y Bangs Laboratories (Fishers, IN). En realizaciones particulares, las partículas magnéticas son las perlas magnéticas MyOne™ Dynabeads® (Dynal Inc.).

El sustrato sólido se puede fabricar a partir de o revestir con un material biocompatible. Como se usa en el presente documento, la expresión "material biocompatible" se refiere a cualquier material que no deteriore de forma perceptible y no induzca ninguna respuesta inmune significativa ni reacción perjudicial a los tejidos, por ejemplo, reacción tóxica o irritación significativa, a lo largo del tiempo cuando se implanta en o se sitúa adyacente al tejido biológico de un sujeto, ni induzca a aglutinación sanguínea o coagulación cuando entra en contacto con la sangre. Los materiales biocompatibles adecuados incluyen, por ejemplo, derivados o copolímeros de poliimidas, poli(etilenglicol), alcohol polivinílico, polietilenoimina, y polivinilamina, poliacrilatos, poliamidas, poliésteres, policarbonatos, y poliestirenos.

En algunas realizaciones, el sustrato sólido se fabrica o se reviste con un material seleccionado entre el grupo que consiste en polidimetilsiloxano, poliimida, tereftalato de polietileno, poli(metacrilato de metilo), poliuretano, poli(cloruro de vinilo), poliestireno polisulfona, policarbonato, polimetilpenteno, polipropileno, un fluoruro de polivinilideno, polisilicona, politetrafluoroetileno, polisulfona, acrilonitrilo butadieno estireno, poli(acrilonitrilo, polibutadieno, poli(tereftalato de butileno), poli(éter sulfona), poli(éter éter cetonas), poli(etilenglicol), resina de estireno-acrilonitrilo, poli(tereftalato de trimetileno), polivinil butiral, poli(difluoruro de vinilideno), poli(vinilpirrolidona), y cualquier combinación de los mismos.

En un aspecto de la invención, las opsoninas recombinantes que se describen en el presente documento se pueden conjugar con el sustrato sólido mediante métodos bien conocidos en la técnica para conjugar péptidos con otras moléculas. Por ejemplo, Hermanson, *BIOCONJUGATE TECHNIQUES* (2ª Ed., Academic Press (2008)) y Niemeyr, *Bioconjugation Protocols: Strategies & Methods*, en *Methods in Molecular Biology* (Humana Press, 2004), proporcionan cierto número de métodos y técnicas para conjugar péptidos a otras moléculas, de Graaf, *et al.*, *20 Biocojugate Chem. 1281* (2009), proporciona una revisión de introducción específica de sitio de aminoácidos no naturales en péptidos para conjugación.

Alternativamente, la superficie del sustrato sólido se puede funcionalizar para incluir moléculas de unión que se unan

selectivamente a la opsonina recombinante. Estas moléculas de unión también se denominan en el presente documento moléculas de afinidad. La molécula de unión se puede unir de forma covalente o no covalente sobre la superficie del sustrato sólido. Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de unión" o "molécula de afinidad" se refiere a cualquier molécula que sea capaz de unirse de forma específica a una opsonina recombinante que se describe en el presente documento. Algunos ejemplos representativos de moléculas de afinidad incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, antígenos, lectinas, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos (ADN, ARN, APN y ácidos nucleicos que son mezclas de los mismos o que incluyen derivados o análogos de nucleótidos); moléculas receptoras, tales como el receptor de insulina; ligandos para receptores (por ejemplo, insulina para el receptor de insulina); y moléculas biológicas, químicas u otras moléculas que tienen afinidad por otra molécula, tal como biotina y avidina. Las moléculas de unión no necesitan comprender una molécula de origen natural completa sino que pueden consistir solo en una parte, fragmento o subunidad de una molécula de origen natural o no natural, como por ejemplo el fragmento Fab de un anticuerpo. La molécula de unión puede comprender además un marcador que se pueda detectar.

La molécula de unión se puede conjugar a la superficie del sustrato sólido usando cualquiera de diversos métodos conocidos por los expertos en la materia. La molécula de unión se puede acoplar o conjugar a la superficie del sustrato sólido de forma covalente o no covalente. La inmovilización covalente se puede conseguir, por ejemplo, a través de acoplamiento de silano. Véase, por ejemplo, Weetall, 15 Adv. Mol. Cell Bio. 161 (2008); Weetall, 44 Meths. Enzymol. 134 (1976). La unión covalente entre la molécula de unión y la superficie también puede estar mediada por un conector. La unión no covalente entre la molécula de afinidad y la superficie se puede basar en interacciones iónicas, interacciones de van der Waals, interacciones dipolo-dipolo, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, y/o interacciones por reconocimiento de forma.

Como se usa en el presente documento, el término "conector" significa un resto molecular que conecta dos partes de una composición. Los conectores peptídicos pueden afectar al plegamiento de una proteína de fusión dada, y también pueden reaccionar con/unirse a otras proteínas, y estas propiedades se pueden analizar de forma sistemática mediante técnicas conocidas. Algunos conectores a modo de ejemplo, además de los que se describen en el presente documento, incluyen una cadena de restos de histidina, por ejemplo, His6; secuencias compuestas por Ala y Pro, que varían el número de pares Ala-Pro para modular la flexibilidad del conector; y secuencias compuestas por restos de aminoácidos cargados, por ejemplo, por mezcla de Glu y Lys. La flexibilidad se puede controlar mediante los tipos y los números de restos en el colector. Véase, por ejemplo, Perham, 30 Biochem. 8501 (1991); Wriggers *et al.*, 80 Biopolymers 736 (2005). Los conectores químicos pueden comprender un enlace directo o un átomo tal como oxígeno o azufre, una unidad tal como NH, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH, o una cadena de átomos, tal como alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno C₂-C₆ sustituido o sin sustituir, alquilo C₂-C₆ sustituido o sin sustituir, arilo C₆-C₁₂ sustituido o sin sustituir, heteroarilo C₅-C₁₂ sustituido o sin sustituir, heterociclilo C₅-C₁₂ sustituido o sin sustituir, cicloalquilo C₃-C₁₂ sustituido o sin sustituir, donde uno o más metilenos pueden estar interrumpidos o terminados con O, S, S(O), SO₂, NH, o C(O).

Las moléculas de unión basadas en ácidos nucleicos incluyen aptámeros. Como se usa en el presente documento, el término "aptámero" significa una secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, de cadena parcialmente sencilla, de cadena parcialmente doble o de cadena doble capaz de reconocer de forma específica una molécula o grupo de moléculas seleccionados que no son oligonucleótidos mediante un mecanismo distinto al emparejamiento de bases de Watson-Crick o formación de tripletes. Los aptámeros pueden incluir, sin limitación, segmentos de secuencia definida y secuencias que comprenden nucleótidos, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de nucleótidos, nucleótidos modificados y nucleótidos que comprenden modificaciones, puntos de ramificación y restos que no son nucleótidos, grupos o puentes en la cadena principal. Los métodos para seleccionar aptámeros que se unen a una molécula se conocen ampliamente en la técnica y son fácilmente accesibles para el experto habitual en la materia.

La opsonina recombinante se puede conjugar con la superficie del sustrato sólido mediante un par de unión por afinidad. La expresión "par de unión por afinidad" o "par de unión" se refiere a una primera y una segunda moléculas que se unen de forma específica entre sí. Un miembro del par de unión se conjuga con la superficie sólida mientras que el segundo miembro se conjuga con la opsonina recombinante. Como se usa en el presente documento, la expresión "unión específica" se refiere a la unión del primer miembro del par de unión con el segundo miembro del par de unión con una afinidad y especificidad mayores que para otras moléculas.

Algunos pares de unión a modo de ejemplo incluyen cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo correspondiente o una parte de unión o fragmento del mismo (por ejemplo, digoxigenina y antidigoxigenina; inmunoglobulina de ratón e inmunoglobulina antiratón de cabra) y pares de unión no inmunológicos (por ejemplo, biotina-avidina, biotina-estreptoavidina), hormonas (por ejemplo, tiroxina y cortisol-proteína de unión a hormonas), receptor-agonista del receptor, receptor-antagonista del receptor (por ejemplo, receptor de acetilcolina-acetilcolina o un análogo de la misma), IgG-proteína A, lectina-carbohidrato, enzima-cofactor de enzima, enzima-inhibidor de enzima, y pares de oligonucleótidos complementarios capaces de formar dupletes de ácido nucleico), y similares. El par de unión también puede incluir una primera molécula que esté cargada negativamente y una segunda molécula que esté cargada positivamente.

Un ejemplo del uso de la conjugación de un par de unión es el método de sándwich con biotina. Véase, por ejemplo, Davis *et al.*, 103 PNAS 8155 (2006). Las dos moléculas que se conjugan conjuntamente están biotinadas y a continuación se conjugan conjuntamente usando estreptoavidina tetravalente como conector. Se puede acoplar un péptido a una secuencia de 15 aminoácidos de un péptido aceptor para la biotinación (denominado AP; Chen *et al.*, 2 Nat. Methods 99 (2005)). La secuencia peptídica aceptora permite la biotinación específica de sitio mediante la enzima biotina ligasa de *E. coli* (BirA; *Id.*). Una opsonina recombinante se puede biotinar de forma similar para su conjugación con un sustrato sólido. También están disponibles numerosos kits comerciales para la biotinación de proteínas. Otro ejemplo para la conjugación a una superficie sólida sería el uso de bioconjugación mediada por PLP. Véase, por ejemplo, Witus *et al.*, 132 JACS 16812 (2010). En este ejemplo, una secuencia de AKT en el extremo N-terminal de Fc permite la conjugación a la superficie sólida y la orientación del dominio de unión a lectina en la orientación óptima señalando hacia afuera de la superficie sólida.

Se ha de observar que la afinidad de un dominio de lectina individual por un azúcar es baja, y la unión está dirigida normalmente por la avidéz y la multivalencia. En el caso de los presentes dispositivos, los dominios de multimerización se suprimen de la proteína, y la multivalencia de la proteína se produce de forma eficaz mediante la unión a un sustrato sólido (por ejemplo, una perla) a alta densidad, densidad que se puede variar para proporcionar la funcionalidad óptima.

Además, en lo que respecta a la MBL, sus características de unión se pueden manipular mediante evolución dirigida para especificidad de unión alterada. Se puede modificar MBL de un modo tal que se una a más de un conjunto limitado de azúcares u otras características moleculares, con el resultado de que la MBL modificada se unirá a más conjuntos limitados de microbios para proporcionar la capacidad para la identificación de una clase de microorganismos patógenos (por ejemplo, uno de virus, bacterias, hongos, o protozoos), tipaje de subclase (por ejemplo, bacterias gramnegativas o grampositivas) o determinación de especies específicas. Están disponibles numerosas estrategias en la técnica.

Por ejemplo, una estrategia de evolución dirigida sencilla examina de forma visual la estructura atómica de la MBL que forma un complejo con un azúcar, y a continuación muta los aminoácidos apropiados para que hagan contacto de una forma específica para el azúcar, de un modo tal que se pierdan los contactos distintivos o se creen tipos particulares de impedimentos históricos. La estructura tridimensional de la MBL de rata se ha resuelto en un complejo con un oligosacárido de alto contenido de manosa y con N-acetilglucosamina, una fucosa metilada, etc. His189Val e Ile207Val son ejemplos de sustituciones cuyas modificaciones alteran la especificidad.

En otra estrategia de evolución dirigida, la proteína se somete a mutagénesis aleatoria y las proteínas resultantes se analizan de forma sistemática para las cualidades deseadas. Esta es una tecnología particularmente útil para la maduración por afinidad de anticuerpos que se presentan en fagos, donde las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo están mutadas mediante mutagénesis por saturación y las variantes con éxito de los seis CDR se barajan conjuntamente para formar los anticuerpos de mayor afinidad.

El paradigma de evolución dirigida se puede aplicar a MBL con el fin de seleccionar variantes de MBL con unión específica a levaduras, bacterias grampositivas, gramnegativas, coagulasa negativas, bacterias aerobias, etc. Sin embargo, para este trabajo, el patrón y la naturaleza de los azúcares diana o las características superficiales relacionadas con estos organismos dianas pueden tener que diferir entre las clases o especies.

Se conoce que MBL se une fuertemente a manosa y N-acetilglucosamina azúcares en hongos, y bacterias grampositivas y gramnegativas. Por ejemplo, se une fuertemente a *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus*, y el grupo A de estreptococos β hemolíticos. MBL tiene una afinidad intermedia por *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., y *Haemophilus influenzae* de tipo b. MBL se une débilmente al grupo B de estreptococos β hemolíticos, *Streptococcus pneumoniae*, y *Staphylococcus epidermidis*. Neth *et al.*, 68 Infect. & Immun. 688 (2000). Se piensa que el polisacárido capsular del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*, *H. influenzae* de tipo b y *Cryptococcus neoformans* disminuye la unión de MBL, como también la endotoxina bacteriana. *Id.*; Van Emmerik *et al.*, 97 Clin. Exp. Immunol. 411 (1994); Schelenz *et al.*, 63 Infect. Immun. 3360 (1995).

Otros han informado que MBL facilita la opsonofagocitosis de levaduras pero no de bacterias, a pesar de la unión de MBL: la ruta de MBL (lectina) del complemento fue crítica para la opsonofagocitosis de levaduras, pero la ruta del complemento clásica fue crítica para la opsonofagocitosis de bacterias. Brouwer *et al.*, 180 J. Immunol. 4124 (2008). Sin embargo, no se informó que MBL se uniera a las especies de bacterias sometidas a ensayo, únicamente que la unión de MBL no estimuló una activación significativa del complemento ni opsonofagocitosis.

Los derivados de MBL con una especificidad particular se pueden aislar mediante el siguiente enfoque, que es una estrategia de presentación en fagos convencional: en primer lugar, expresar un conjunto de variantes de MBL de un vector fagémido; a continuación unir esta biblioteca a una diana de interés (por ejemplo, *E. coli*) y llevar a cabo una o dos rondas de selección; y a continuación llevar a cabo una ronda de selección negativa frente a una diana relacionada (por ejemplo, *Candida*), tomando los fagémidos que fracasan en la unión. A continuación, estos ciclos de selección positiva y negativa se repiten hasta que se genere una población de fagos que se una generalmente a la diana y no se una a la no diana. Este método se puede aplicar a cualquier par de cepas microbianas frente a las que

se desea una unión diferencial, tales como bacterias que son resistentes y sensibles a un antibiótico dado. Esta estrategia de enriquecimiento positivo/negativo también se puede usar con una biblioteca de anticuerpo-presentación en fagos, que es una forma incluso más convencional de aislar tales aglutinantes específicos.

5 MBL pertenece a la clase de colectinas de la superfamilia de lectinas de tipo C (dependientes de calcio), otros miembros de la cual, tales como la proteína tensioactiva A, la proteína tensioactiva T, CL-L1 y CL-P1, pueden ser útiles en la presente invención. Otras opsoninas posibles incluyen ficolinas (Thiel *et al.*, 1997), que también activan la ruta del complemento de la lectina y se unen a proteínas MASP. Estas proteínas están relacionadas con MBL pero tienen una especificidad diferente y más limitada. En el contexto del dispositivo diagnóstico que se describe en el presente documento, una opción es usar simplemente el dominio de lectina de una ficolina que se corresponde con el dominio de lectina de la MBL que se ha descrito anteriormente. Otro enfoque es el uso del "barajado" de segmentos o aminoácidos individuales entre MBL y una o más ficolinas para crear moléculas híbridas que puedan tener especificidades híbridas. El enfoque de evolución y selección dirigidas que se ha descrito anteriormente también se podría usar potencialmente para generar fragmentos de anticuerpos humanos o péptidos que proporcionen la especificidad de clase, subclase y especie que se ha descrito anteriormente.

Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción y expresión de FcMBL.81

20 Se construyó una realización de una configuración obtenida por ingeniería genética de MBL, útil como opsonina genérica para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas, usando los dominios de "cuello" y "lectina" de MBL. La Prolina 81 (como se define en el archivo estructural 1HUP del Colaboratorio de Investigación para la Bioinformática Estructural, Banco de Datos de Proteínas, (RCSB PDB)) se seleccionó como el punto N-terminal en el que comienza la secuencia de la lectina. Esta parte de la molécula de lectina se condensó corriente abajo (C-terminal) a la porción Fc de gama 1 humana (Fc_γ). En la Figura 3 se muestra un diagrama de la construcción de la opsonina obtenida por ingeniería genética. En la Figura 4 se muestra un esquema de la porción Fc de un clon. Los aminoácidos para esta construcción incluyen los siguientes restos:

30 Secuencia proteica de Fc

```
001 epkssdktht cppcpapell ggpsvflfpp kpkdtlmisr tpevtcvvvd vshedpevkf
061 nwyvdgvevh naktkpreeq ynstyrvsv ltvlhqdwln gkeykckvsn kalpapiekt
121 iskakgqpre pqvytlppsr deltknqvs1 tclvkgfyys diavewesng qpennykttp
181 pvldsdgsff lyskltvdk s rwqqgnvfsc svmhealnhh ytqkslslsp ga (SEQ ID NO: 1)
```

35 Secuencia proteica de MBL.81 (está incluye la región de cuello enrollada en espiral y los dominios de reconocimiento de carbohidrato (CRD) de MBL humana):

```
81 pdgdsslaas erkalqtema rikkwltfsl gkqvgnkffl tngeimtfek vkalcvkfqa
141 svatprnaae ngaiqnlike eaflgitdek tegqfvdltg nrltytnwne gepnagsde
201 dcvllllkngq wndvpcstsh lavcefpi (esta secuencia corresponde con los restos 1-148 de SEQ ID
```

40 NO: 2)

Secuencia de Fc-MBL.81:

```
001 epkssdktht cppcpapell ggpsvflfpp kpkdtlmisr tpevtcvvvd vshedpevkf
061 nwyvdgvevh naktkpreeq ynstyrvsv ltvlhqdwln gkeykckvsn kalpapiekt
121 iskakgqpre pqvytlppsr deltknqvs1 tclvkgfyys diavewesng qpennykttp
181 pvldsdgsff lyskltvdk s rwqqgnvfsc svmhealnhh ytqkslslsp gapdgdssla
241 aserkalqte marikkwltf slgkqvgnkf fltngeimtf ekvkalcvkf qasvatprna
301 aengaiqnli keeaflgitd ekteqfvd1 tgnrltytnw negepnags dedcvlllkn
45 361 gqwndvpcst shlavcefpi (SEQ ID NO: 3)
```

De ese modo, la construcción de FcMBL.81 consiste en una lectina que tiene los restos de aminoácido 81 (prolina) a 228 (isoleucina) de MBL, condensada con una porción Fc_γ. En uso, la porción Fc se dimeriza y añade avida a la débil afinidad de la unión de las lectinas MBL a los azúcares monoméricos. Cuando se diseña Fc MBL.81 para su uso como reactivo diagnóstico, la glucosilación unida en N se puede retirar cambiando el aminoácido en 297 de asparagina a ácido aspártico (N297D), o el aminoácido 82 en la construcción de Fc. Fc glucosilado se mantiene en la orientación correcta para ADCC y CDC mediada por Fc. Además, se puede clonar un resto de cisteína en la opsonina obtenida por ingeniería genética para permitir la unión a un sustrato sólido a través de conjugación química. La construcción y la expresión de una opsonina obtenida por ingeniería genética, tal como FcMBL, se puede conseguir mediante diversas técnicas conocidas en la técnica; véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.541.087.

La expresión de la construcción en células transfectadas transitoriamente se demuestra en las Figuras 8A y 8B. La FcMBL.81 expresó aproximadamente 35 mg/l.

Ejemplo 2. Comparación de la construcción Fc MBL.81 con MBL de longitud completa en unión a levadura.

- 5 Se inocularon aproximadamente 5,5 millones células de la levadura *Candida albicans* con números variables de perlas de MBL revestidas con MBL de tipo salvaje, de longitud completa (hexámeros de trímeros) o Fc MBL.81. Como se representa gráficamente en la Figura 9, 18 millones de perlas con MBL de tipo salvaje, de longitud completa o Fc MBL.81 se unieron a las 5,5 millones de células fúngicas. Este ejemplo muestra que las perlas de Fc
- 10 MBL.81 son tan activas como las perlas de MBL de tipo salvaje, de longitud completa en la unión a *C. albicans*.

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión de opsonina recombinante que comprende:

5 un dominio de reconocimiento de carbohidrato de una lectina de unión a manosa (MBL) en donde el dominio de reconocimiento de carbohidrato permite la unión a manosa en la superficie de un microbio condensado a una porción Fc de una inmunoglobulina, en donde la proteína de fusión de opsonina recombinante excluye un dominio funcional de la opsonina que se une a una serina proteasa asociada a lectina de unión a manano (MASP).

10 2. La proteína de fusión de opsonina recombinante de la reivindicación 1, en la que la MBL es MBL humana.

3. La proteína de fusión de opsonina recombinante de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además al menos un resto de cisteína que permite la reticulación química a un sustrato sólido.

15 4. La proteína de fusión de opsonina recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que:

- (i) la porción Fc de la inmunoglobulina comprende una bisagra o una interfase CH2-CH3 de un dominio Fc de IgG;
- 20 (ii) la proteína de fusión comprende además un segmento de Glicina + Serina o un segmento de Prolina + Alanina + Serina situado entre el dominio de reconocimiento de carbohidrato y la porción Fc de una inmunoglobulina; o
- (iii) la porción Fc de la inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en la que está modificado opcionalmente el resto de aminoácido 82 de asparagina (N) a ácido aspártico (D).

25 5. La proteína de fusión de opsonina recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que está unida a un sustrato sólido.

30 6. La proteína de fusión de opsonina recombinante de la reivindicación 5, en la que el sustrato sólido es una microperla magnética, una microperla paramagnética, una membrana microporosa, una fibra hueca o cualquier otra membrana de filtración o dispositivo de flujo de fluidos.

35 7. La proteína de fusión de opsonina recombinante de la reivindicación 5, en la que el sustrato sólido es una célula viva o la matriz extracelular de un tejido o un órgano biológico, opcionalmente en la que dicha célula viva es un fagocito.

8. La proteína de fusión de opsonina recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dominio de reconocimiento de carbohidrato comprende:

- 40 (i) los restos de aminoácido 81 (prolina) a 228 (isoleucina) de MBL (que se exponen como los restos 1-148 de SEQ ID NO: 2);
- (ii) los restos de aminoácido 81 (prolina) a 228 (isoleucina) de MBL (que se exponen como los restos 1-148 de SEQ ID NO: 2), condensados a la porción Fc de IgG humana (Fcγ) que se exponen en SEQ ID NO: 3; o
- 45 (iii) un extremo N-terminal que comienza en la glicina 111 de la MBL humana.

9. La proteína de fusión de opsonina recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el extremo N-terminal consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de alanina-lisina-treonina (AKT).

50 10. Método para recoger un microorganismo de unión a opsonina de un fluido, que comprende poner en contacto el fluido con una proteína de fusión de opsonina recombinante conjugada a una superficie sólida; en el que la proteína de fusión de opsonina recombinante comprende un dominio de reconocimiento de carbohidrato de una lectina de unión a manosa (MBL) en donde el dominio de reconocimiento de carbohidrato permite la unión a manosa que está presente en la superficie de un microbio, condensado a una porción Fc de una inmunoglobulina, en donde la proteína de fusión excluye un dominio funcional de la opsonina que se une a una serina proteasa asociada a lectina de unión a manano (MASP).

55 11. El método de la reivindicación 10:

- (i) que comprende además la etapa de identificar el microorganismo;
- 60 (ii) en el que el fluido es un fluido biológico, en el que el fluido se selecciona opcionalmente entre el grupo que consiste en sangre, líquido cefalorraquídeo, fluido articular, orina, semen, saliva, lágrimas y fluidos recogidos mediante procedimientos con aguja, de biopsia o de aspiración;
- (iii) en el que el fluido se obtiene a partir de una muestra de agua o de alimento; y/o
- 65 (iv) que comprende además separar dicho fluido de una opsonina recombinante unida a microorganismo, opcionalmente en el que la separación se consigue por aplicación de una fuerza magnética al fluido después de que el microorganismo de unión a opsonina se haya unido al conjugado opsonina recombinante-superficie sólida

cuando la superficie sólida es una partícula magnética.

12. El método de la reivindicación 11 (ii), en el que el fluido biológico es sangre.
- 5 13. El uso de la proteína de fusión de opsonina recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en:
 - (i) la identificación de un microorganismo patógeno; o
 - (ii) la identificación de contaminación en agua o alimentos.
- 10 14. Una proteína de fusión de opsonina recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad infecciosa o sepsis, opcionalmente en donde el tratamiento se combina además con un tratamiento o una terapia adicionales.

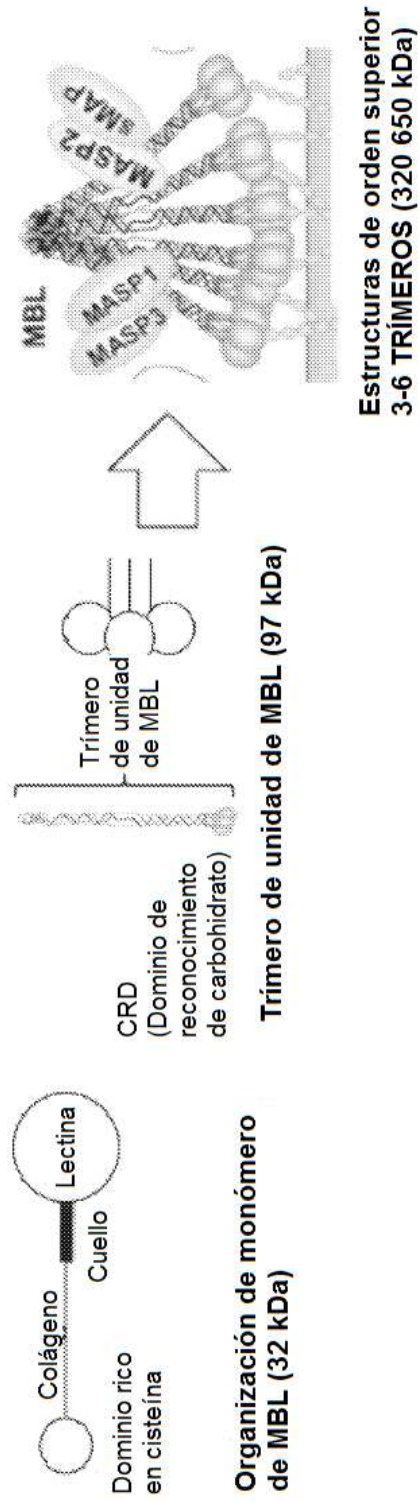


Figura 1



Figura 2A

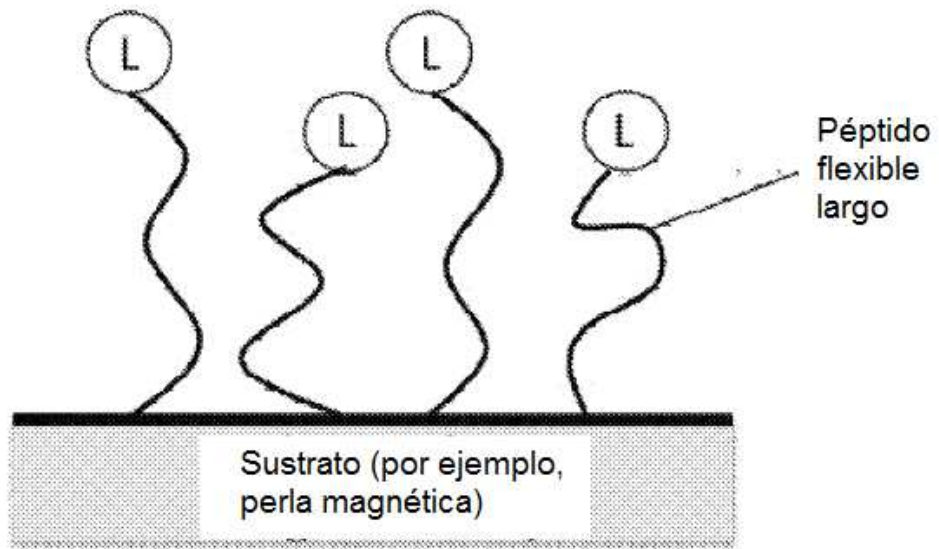


Figura 2B

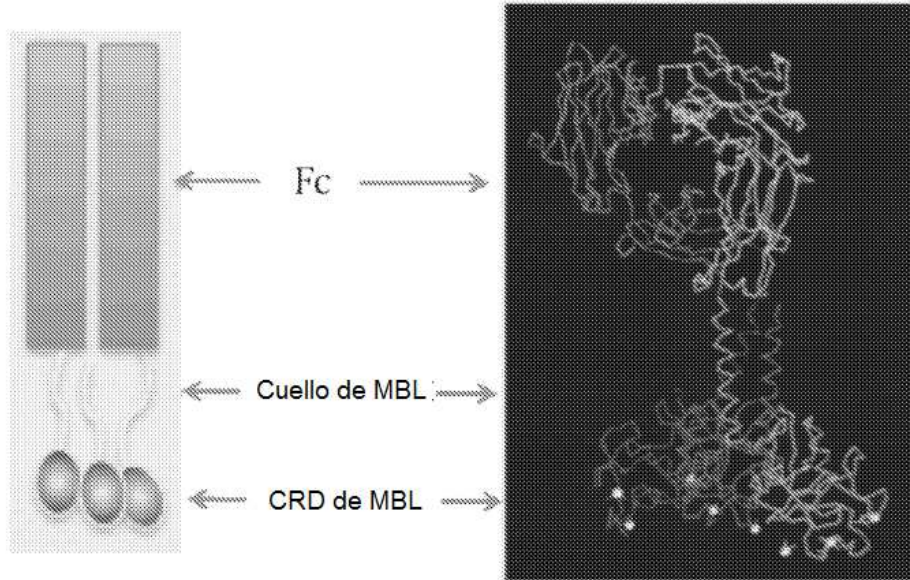


Figura 3

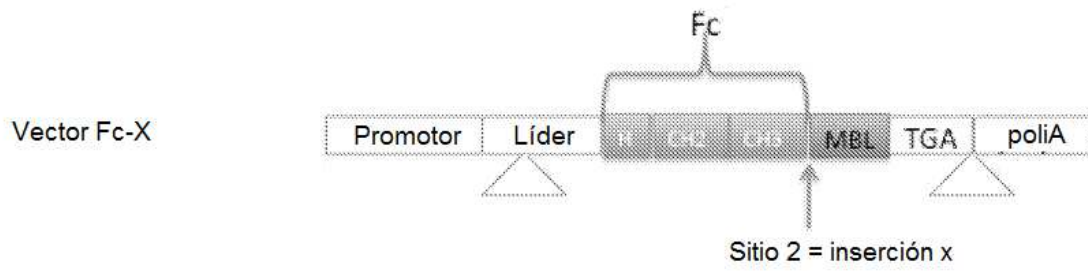


Figura 4

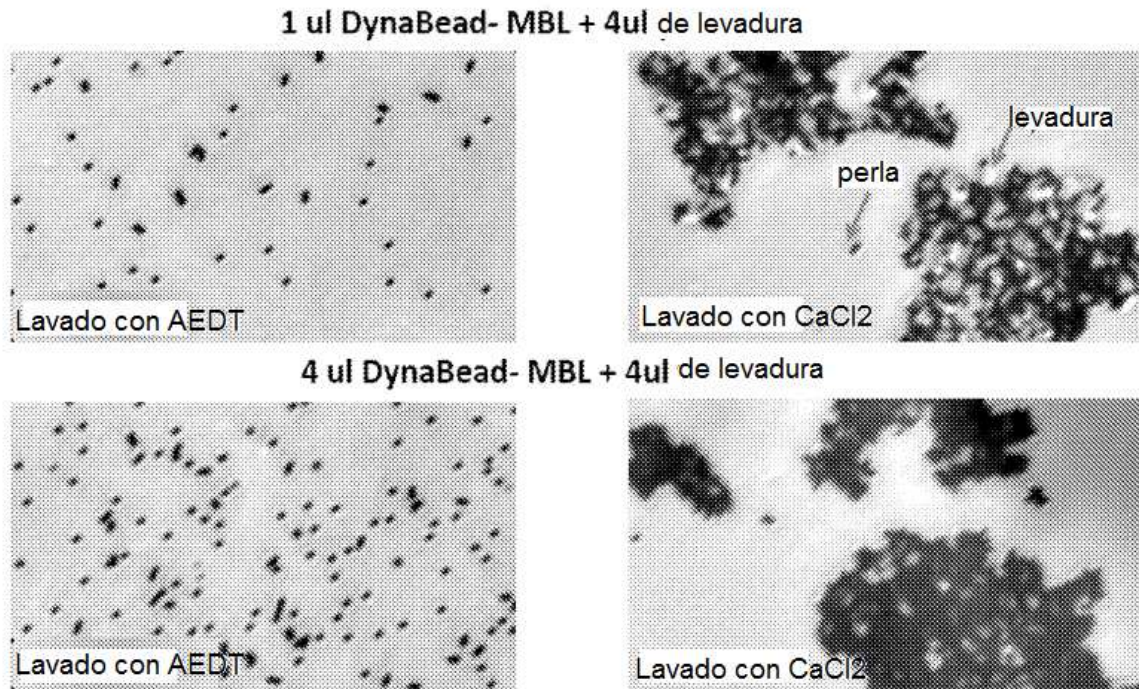


Figura 5

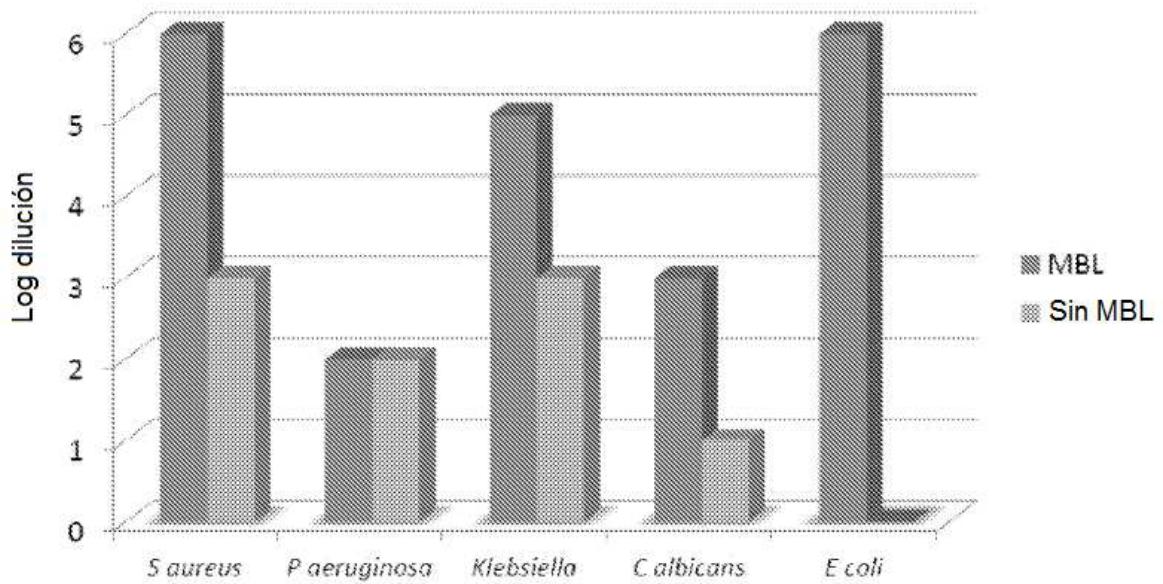


Figura 6

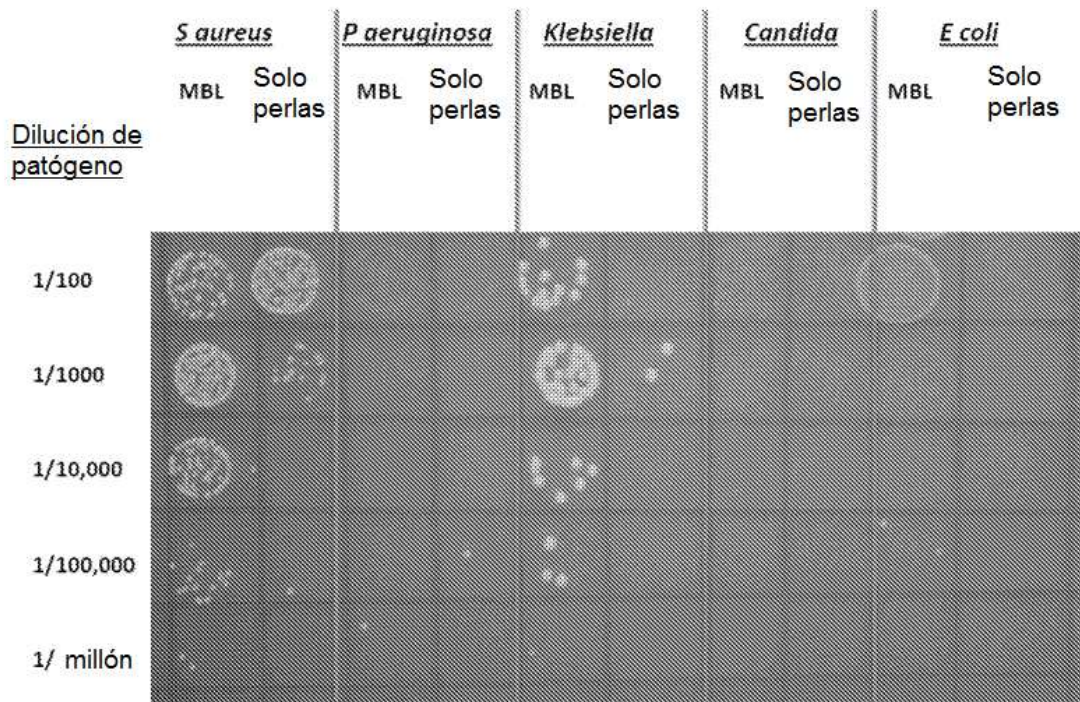


Figura 7

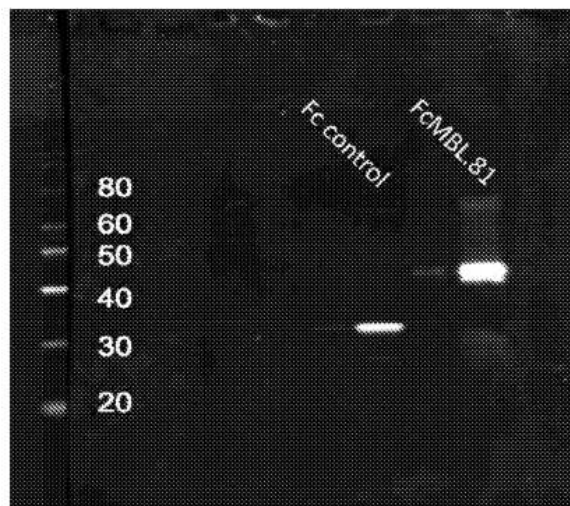


Figura 8A

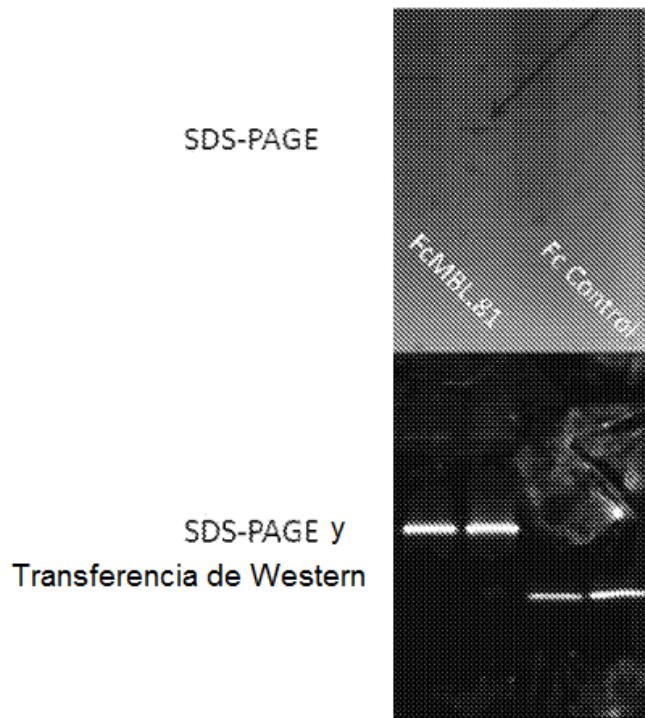


Figura 8B

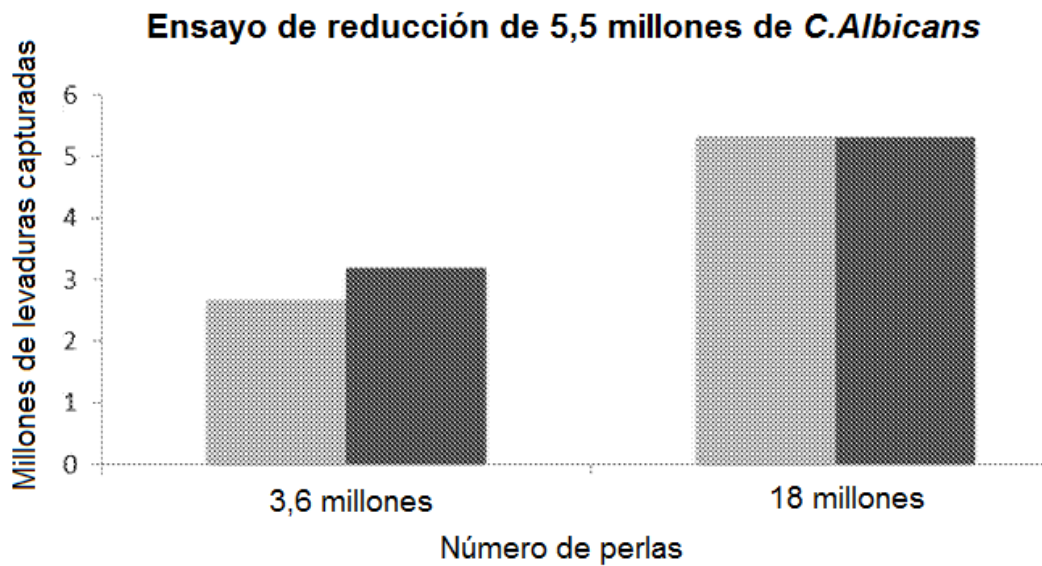


Figura 9