



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 271 468**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03029993 .7**

(86) Fecha de presentación : **10.05.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1402897**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2004**

(54) Título: **Nuevas indicaciones de la lectina de unión a manano (MBL) en el tratamiento de individuos inmuno-comprometidos.**

(30) Prioridad: **14.05.1999 DK 1999 00668**
20.10.1999 DK 1999 01508

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

(73) Titular/es: **Steffen Thiel**
Nordtoftevej 11
8240 Risskov, DK
Jens Christian Jensenius

(72) Inventor/es: **Thiel, Steffen y**
Jensenius, Jens Christian

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Nuevas indicaciones de la lectina de unión a manano (MBL) en el tratamiento de individuos inmunocomprometidos.

Campo técnico

La presente invención se refiere al uso de subunidades y oligómeros de la lectina de unión a manano (MBL) en el tratamiento profiláctico y/o curativo de un individuo inmunocomprometido.

Antecedentes de la invención

Se conocen varios grupos de lectinas, es decir, de proteínas de unión a carbohidratos en el hombre. Uno de los grupos lo constituyen las lectinas tipo C. Las lectinas tipo C contienen un dominio de reconocimiento de carbohidratos dependiente del calcio (un CRD tipo C)¹. La lectina de unión a manano (MBL), sinónimo de lectina de unión a manosa, proteína de unión a manano o proteína de unión a manosa (MBP), pertenece al subgrupo de lectinas tipo C, llamadas colectinas, ya que estas proteínas solubles están compuestas por subunidades que presentan tres CRD unidos a un esqueleto de colágeno². Las MBL interaccionan con los hidratos de carbonos que presentan una gran variedad de microorganismos y existen cada vez más pruebas que demuestran que desempeñan un papel importante en la defensa inmune innata³. La MBL, cuando se encuentra unida a un hidrato de carbono, es capaz de activar el sistema del complemento.

El sistema del complemento se puede activar a través de tres vías diferentes: la vía clásica, la vía alternativa y la recién descrita tercera vía, la vía de las lectinas de unión a manano (MBL), que se inicia con la unión de la MBL a los hidratos de carbono presentados por los microorganismos. Los componentes de la vía alternativa y de la vía de las MBL son parte de la respuesta inmune innata, también llamada respuesta inmune natural o no clonal, mientras que la vía clásica implica la cooperación con anticuerpos de la respuesta inmune específica⁴.

La proteína MBL humana se compone de hasta 18 cadenas idénticas de polipéptidos de 32 kDa²⁷, comprendiendo, cada una de ellas, un segmento corto N-terminal de 21 aminoácidos que incluye tres residuos cisteína, seguido de 7 repeticiones del motivo del colágeno Gly-X-Y, interrumpidas por un residuo Gln y seguidas de otras 12 repeticiones Gly-X-Y. Una pequeña "región cuello" de 34 residuos une el dominio lectina dependiente del calcio C-terminal de 93 aminoácidos con la parte colagenosa de la molécula²⁸.

Las regiones colagenosas de las tres cadenas polipeptídicas se combinan para formar una subunidad que se estabiliza covalentemente mediante puentes disulfuro. Las subunidades individuales están unidas mediante puentes disulfuro así como mediante interacciones no covalentes²⁷.

La posición de estos tres puentes disulfuro, sin embargo, no se ha resuelto completamente. El análisis de las MBL por SDS-PAGE en condiciones no reductoras muestra bandas con un peso molecular (m.w.) aparente mayor de 200 kDa que representan presumiblemente bloques de 3, 4, 5 e incluso 6 subunidades ensambladas²⁷.

El número real de subunidades en la proteína MBL natural humana ha sido controvertido. Lipscombe y col. (1995) obtuvieron datos mediante ultracentrifugación que sugerían que el 25% de la MBL sérica humana estaba constituida por 2-3 subunidades y sólo una fracción poco importante alcanzaba un tamaño de 6 subunidades. La cuantificación relativa, que se llevó a cabo por densitometría de las hibridaciones tipo Western reveladas por quimioluminiscencia²⁷ obtenidas del análisis por SDS-PAGE de fracciones procedentes de cromatografía de intercambio iónico, mostró que la especie predominante de cadenas de subunidades de MBL unidas de forma covalente consistía en tetrámeros mientras que solamente los complejos pentaméricos y hexaméricos activaban el complemento. Por el contrario, el análisis por cromatografía de permeación de gel (GPC) sugiere que la MBL es comparable en tamaño al complejo C1. La GPC se puede llevar a cabo en condiciones que permitan un estudio de la importancia de las interacciones débiles proteína-proteína en la formación de las moléculas de MBL. El contenido en MBL de las fracciones de la GPC se puede determinar mediante técnicas estándar para el ensayo de MBL.

La MBL es sintetizada en el hígado por los hepatocitos y secretada a la sangre. Se une a estructuras de hidratos de carbono de bacterias, levaduras, protozoos parasitarios y virus, y exhibe una actividad antibacteriana matando a los microorganismos mediante la activación de los componentes terminales y líticos del complemento o promoviendo la fagocitosis (opsonización). La estructura en forma de bouquet de las MBL es bastante similar a la estructura de tipo ramillete de C1q, el subcomponente del primer componente de la vía clásica capaz de unirse a inmunoglobulinas³. C1q se asocia con dos serín proteasas, C1r y C1s, para formar el complejo C1. De forma similar, MBL está asociada con dos serín proteasas, MASP-1⁵ y MASP-2⁶, y una proteína adicional llamada Map19. MASP-1 y MASP-2 tienen estructuras modulares idénticas a las de C1r y C1s⁶. La unión de MBL a hidratos de carbono induce la activación de MASP-1 y MASP-2. MASP-2 genera entonces la convertasa de C3, C4bC2b, mediante la unión de C4 y C2. Algunos informes sugieren que MASP-1 puede activar C3 directamente. No se sabe nada acerca de la estequiometría y la secuencia de activación de los complejos MBL/MASP. La MBL también ha sido caracterizada en otros animales como los roedores, el ganado, los pollos y los monos.

La concentración de MBL en suero humano está determinada, en gran medida, genéticamente, pero, parece ser, que aumenta hasta tres veces durante las reacciones de fase aguda⁸. Tres mutaciones que dan lugar a alteraciones estructurales y dos mutaciones en la región promotora se asocian con la deficiencia de MBL⁹. La deficiencia de MBL se asocia con una susceptibilidad a diversas infecciones. El estudio de cinco individuos adultos con infecciones graves e inusuales demostró que tres de ellos eran homocigotos para mutaciones estructurales de MBL y dos de ellos heterocigotos¹⁰. El estudio de 229 niños, en colaboración con el Danish National Hospital, que presentaban inmunodeficiencias no relacionadas con el VIH, mostró una frecuencia diez veces mayor de homocigosis para alelos mutantes de la estructura de MBL que la que se observó en el grupo control¹¹. La determinación de los alotipos en 617 niños hospitalizados consecutivamente en el St Mary's Hospital de Londres mostró una frecuencia significativamente mayor de homocigosis y heterocigosis para alotipos mutantes en los niños infectados que en los niños no infectados¹².

Se puede unir una gran variedad de oligosacáridos a MBL. Ya que los azúcares diana no están normalmente expuestos en la superficie de células de mamíferos en altas concentraciones, las MBL no suelen reconocer determinantes propios, pero se encuentran especialmente bien adaptadas para interactuar con superficies celulares microbianas que presentan determinantes hidratos de carbono repetitivos. Se ha demostrado, *in vitro*, que levaduras (*Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*), virus (VIH-1, VIH-2, HSV-2 y varios tipos de influenza A) y una serie de bacterias son reconocidos por la MBL. En el caso de algunas bacterias, la presencia de una cápsula impide la unión de MBL¹³. Sin embargo, incluso las bacterias encapsuladas (*Neisseria meningitidis*) pueden mostrar una unión fuerte a MBL¹⁴.

Los microorganismos, que infectan a individuos deficientes en MBL, representan muchas especies diferentes de origen bacteriano, viral o fúngico^{12,15-17}. La deficiencia también se asocia con abortos de repetición¹⁸. De hecho, MBL podría ser una molécula de defensa general frente a la mayoría de las bacterias, y ser considerada así como una de las razones por las cuales tantas bacterias no son patogénicas.

Mientras que cada vez más datos apoyan la idea de un efecto protector de las MBL también existen observaciones que sugieren que la infección por algunos microorganismos, en particular, patógenos intracelulares, alcanza una mayor frecuencia en individuos con suficientes MBL que en individuos con una deficiencia de MBL^{19,20}. Esto concuerda con los resultados de un experimento en animales, en el que se encontró un número aumentado de HSV-2 en el hígado de ratones a los que se había inyectado previamente MBL humana²¹.

Se ha obtenido MBL de calidad clínica a partir de plasma de la sangre de un donante y su infusión ha demostrado ser segura²². Se ha logrado la producción de MBL recombinante con una estructura y una actividad posiblemente similares a las de la MBL nativa (solicitud de patente PA 1999 00668/C5/KH).

El documento WO8901519 describe un ácido nucleico que codifica al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos de proteína de unión a manosa humana. También se describe un procedimiento para el tratamiento de animales infectados con una bacteria, hongo o virus. El procedimiento implica proporcionar un péptido capaz de unirse a las unidades de manosa de estos organismos. El péptido es capaz de provocar que las células defensoras del hospedador se vean atraídas hacia los organismos.

Resumen de la invención

La invención se refiere al uso de MBL, purificada a partir de fuentes naturales o a partir de material producido por tecnologías recombinantes, o por cualquier otra línea celular adecuada productora de MBL, para la profilaxis y/o tratamiento de infecciones. Se puede asociar con un tratamiento terapéutico o médico, como por ejemplo el uso de un tratamiento citotóxico. La MBL se puede administrar antes o después de empezar el tratamiento médico y durante un periodo de tiempo cualquiera considerado adecuado.

La invención en un aspecto se refiere al uso de al menos una subunidad de MBL o un oligómero de MBL que comprende dicha al menos una subunidad de MBL para la fabricación de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de infección en un individuo que tiene un nivel sérico de MBL superior a 50 ng/ml de suero.

La invención se refiere también al tratamiento de personas que tienen niveles normales de MBL, ya que es probable que estos individuos se beneficien de la administración de MBL - previa a cualquier tratamiento citotóxico.

Por lo tanto, desde un punto de vista, la invención se refiere al tratamiento y/o la profilaxis de infecciones en individuos que sufren un estado de inmunocompromiso, o del tratamiento de individuos que es probable que contraigan dicho estado debido a un tratamiento que se sabe se asocia a la aparición de un estado de inmunocompromiso. Los ejemplos de estos tratamientos son, por ejemplo, la quimioterapia y la radioterapia, como por ejemplo el tratamiento con rayos X.

La quimioterapia y la radioterapia se presentan como parte del tratamiento de diversas formas de cáncer, que tienen como objetivo retrasar la progresión de la enfermedad o revertir dicha progresión mediante un tratamiento curativo. La quimioterapia y la radioterapia generan un inmunocompromiso ya que se están destruyendo células del sistema inmune, llevando así a un estado de inmunosupresión especialmente caracterizado por neutropenia.

Se cree que la MBL ejerce su actividad antimicrobiana principalmente a través de su actividad en la opsonización (preparación de los microorganismos para la fagocitosis). Esta actividad es dependiente de la activación del comple-

mento tras la unión de la MBL a la superficie microbiana y la unión de C4b y C3b al microorganismo. La MBL también puede promover la lisis directa mediada por complemento del microorganismo a través de la activación de la vía lítica terminal del complemento y la inserción del complejo de ataque a la membrana (MAC) en la membrana. Este mecanismo se considera poco importante. Muchos microorganismos, como las bacterias Gram-positivas como, por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae*, son resistentes al MAC, pero pueden ser eliminadas por opsonofagocitosis. Considerando la opsonofagocitosis como el principal mecanismo efector de la eliminación de microorganismos mediada por las MBL, es una sorpresa que el tratamiento con MBL pueda ser beneficioso en personas deficientes en las células fagocíticas más importantes, es decir, los neutrófilos.

Hace cerca de 30 años que se reconoció la importancia de la neutropenia en el riesgo de infecciones severas en individuos con cáncer que están recibiendo quimioterapia citotóxica²³. De este modo, se producen infecciones con mucha frecuencia en individuos con cánceres hematológicos y de otros tipos que son sometidos a quimioterapia y otras intervenciones terapéuticas que den lugar a un inmunocompromiso. De forma sincrónica al uso intensivo de quimioterapia, están aumentando los problemas con las infecciones y constituyen, en este momento, un importante reto en las medidas de soporte²⁴. Por lo tanto, todos los servicios de hematología y oncología usan muchos recursos para combatir las infecciones. Esta lucha se está haciendo, a un ritmo constante, cada vez más difícil debido a la aparición de cepas bacterianas multirresistentes.

Los individuos desprovistos de los componentes celulares importantes del sistema inmune durante o después de un estado de inmunocompromiso dependen de un sistema inmune humoral innato eficaz, como el sistema del complemento, por ejemplo, durante periodos de neutropenia. No existen, en la actualidad, factores pronósticos suficientemente exactos y fiables capaces de predecir un aumento del riesgo de infecciones severas en individuos tratados con quimioterapia, radioterapia u otros tratamientos inmunocomprometedores²⁴.

Por lo tanto, un estado de inmunocompromiso que surge de un tratamiento médico probablemente exponga, al individuo en cuestión, a un mayor riesgo de infección. De acuerdo con la invención, es posible tratar profilácticamente una infección en un individuo que presenta un estado de inmunocompromiso antes o durante tratamientos que se sabe generan este estado. Mediante el tratamiento profiláctico con MBL antes o durante un tratamiento que se sabe genera dicho estado es posible prevenir una infección ulterior o reducir el riesgo en el individuo de contraer una infección debido al estado de inmunocompromiso. Si el individuo contrajera una infección, por ejemplo, tras un tratamiento que lleva a un estado de inmunocompromiso, también es posible tratar la infección administrando al individuo una composición de MBL de acuerdo con la invención.

La invención también está dirigida a tratamientos de deficiencias de la misma mediante la infusión de MBL. Además, la invención está dirigida al uso de las concentraciones de MBL en plasma para predecir el riesgo de infección en individuos sometidos, por ejemplo, a quimioterapia.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende al menos una subunidad de lectina de unión a manano (MBL) o al menos un oligómero que comprenda la al menos una subunidad de lectina de unión a manano (MBL) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico, mejorante o curativo de una infección en un individuo que inicialmente tenía niveles plasmáticos de MBL superiores a 50 ng/ml. En particular el individuo puede estar genéticamente predispuesto a una deficiencia de MBL o haber adquirido una deficiencia de MBL que haya conducido a un aumento del riesgo de sufrir infecciones. De acuerdo con esto, la invención también se refiere al tratamiento de infecciones en individuos que sufren de una deficiencia de lectina de unión a manano (MBL) incluyendo cualquier deficiencia en la producción de MBL y/o función de MBL.

En otro aspecto más se proporciona un procedimiento para la estimación de la probabilidad de la aparición de cualquier infección clínicamente significativa en un individuo sometido a quimioterapia o a cualquier otra forma de tratamiento inmunocomprometedor, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de medir la concentración de MBL en el plasma o suero obtenido del individuo y estimar la probabilidad sobre la base de la concentración medida.

En el presente contexto, inmunocomprometido se usa con su significado normal, es decir, un individuo que no es capaz de provocar una respuesta inmune adecuada debido a una deficiencia primaria o secundaria, inducida o no, en uno o más de los elementos del sistema de defensa inmune normal.

Descripción detallada de la invención

Hasta la fecha, las MBL se han usado para tratar deficiencias de MBL y, así, las que han sido definidas por un nivel arbitrario menor de 50 ng/ml, o más frecuentemente menor de 10 ng/ml de suero, que es con frecuencia idéntico a la sensibilidad de varios ensayos para la determinación de MBL y el nivel ha sido por lo tanto ajustado como el nivel para el cual no se podían detectar sustancialmente MBL en los distintos ensayos de técnicas anteriores.

Por la presente invención se ha demostrado que las infecciones se pueden prevenir y/o tratar en individuos inmunocomprometidos independientemente de su nivel sérico de MBL. En particular, las infecciones se pueden prevenir en individuos inmunocomprometidos, cuando se administra MBL a estos individuos, que tienen un nivel de MBL superior a 50 ng/ml de suero. Los individuos con un nivel de MBL superior a 75 ng/ml de suero también pueden necesitar un tratamiento, como los individuos que tienen un nivel de MBL superior a 100 ng/ml de suero y los individuos que tienen un nivel de MBL superior a 150 ng/ml de suero.

El tratamiento con MBL de infecciones también se puede llevar a cabo administrando MBL a estos individuos en combinación con antibióticos, agentes antivirales y agentes antifúngicos pertinentes.

En particular, los individuos con riesgo de padecer un estado de inmunocompromiso como resultado de un tratamiento médico se beneficiarán del tratamiento profiláctico con MBL antes, durante y quizás también después del tratamiento, con objeto de prevenir enfermedades asociadas con el estado de inmunocompromiso, como las infecciones.

En general, todos los individuos inmunocomprometidos o con riesgo de inmunocompromiso deberían ser tratados con MBL, independientemente de un nivel específico de MBL. La razón detrás de esto es que las infecciones pueden llevar a la depleción de MBL, y por lo tanto una "dosis de refuerzo", incrementando el nivel de MBL inicialmente disminuirá el riesgo de depleción de MBL hasta un nivel por debajo de un nivel de deficiencia, y el sistema inmune de estos pacientes se puede reforzar mediante la administración de MBL recombinante o derivada de plasma natural. En particular, las infecciones se pueden prevenir cuando se administra MBL a individuos que tienen un nivel de MBL superior a 50 ng/ml de suero. Los individuos con un nivel de MBL superior a 75 ng/ml de suero también pueden necesitar un tratamiento, como los individuos que tienen un nivel de MBL superior a 100 ng/ml de suero y los individuos que tienen un nivel de MBL superior a 150 ng/ml de suero.

Los presentes inventores también han demostrado en la presente memoria descriptiva que, en particular, los individuos que tienen un nivel de MBL menor de 500 ng/ml de suero, en relación con un estado de inmunocompromiso, se beneficiarán del tratamiento con MBL. Por consiguiente, en particular, los individuos que tienen un nivel de MBL menor de 400 ng/ml se beneficiarán, como los individuos que tienen un nivel de MBL menor de 300 ng/ml, como los individuos que tienen un nivel de MBL menor de 250 ng/ml, como los individuos que tienen un nivel de MBL menor de 200 ng/ml.

Así, en una forma de realización preferida la presente invención se refiere al uso de MBL para la fabricación de un medicamento para individuos que tienen un nivel de MBL en suero dentro del intervalo de 50-500 ng/ml, como en el intervalo de 100-500 ng/ml para tratar y/o prevenir infecciones, en particular, en relación con un estado de inmunocompromiso en el individuo.

El estado de inmunocompromiso se puede deber a un tratamiento médico tal como se ha comentado más arriba, es decir, quimioterapia u otro tratamiento inmunosupresor, como el que es inducido por el tratamiento con esteroides, ciclofosfamida, azatioprina, metotrexate, ciclosporina y/o rapamicina, en particular, en relación con el tratamiento del cáncer.

El estado de inmunocompromiso también se puede deber a una inmunodeficiencia adquirida, como el SIDA o una leucemia, en particular, neutropenia u otras inmunodeficiencias secundarias.

Además, los individuos que tienen un nivel de MBL por encima de 50 ng/ml y por debajo de 500 ng/ml se beneficiarán del tratamiento con MBL en general, con objeto de prevenir infecciones, en particular, infecciones crónicas.

Un grupo de individuos que necesita un tratamiento con MBL con objeto de prevenir y/o tratar infecciones son los individuos que tienen un nivel bajo de MBL funcional, independientemente del nivel de MBL en sí. Esto se debe al hecho de que para algunas mutaciones de MBL, se ha visto que, aunque se expresan en suero subunidades de MBL y oligómeros de la misma, la funcionalidad de las mismas es baja. La funcionalidad o actividad funcional de MBL se puede estimar por su capacidad para formar un complejo MBL/MASP que lleva a la activación del sistema del complemento. Cuando C4 es unido por MBL/MASP se expone un tiol éster activo y C4 se une covalentemente a los grupos nucleofílicos cercanos. Una parte sustancial de C4b se unirá así al pocillo de plástico revestido y se podrá detectar con un anticuerpo anti-C4.

Un TRIFMA cuantitativo para la detección de la actividad funcional de MBL se realiza 1) revistiendo los pocillos de una placa de microvaloración con 1 mg de manano en 100 ml de tampón; 2) bloqueando con Tween 20; 3) aplicando las muestras de test, por ejemplo preparaciones de MBL diluidas; 4) aplicando suero deficiente en MBL (esto lleva a la formación del complejo MBL/MASP); de forma alternativa la MBL y el suero deficiente en MBL se pueden mezclar antes de la aplicación en los pocillos de microvaloración; 5) aplicando factor C4 del complemento purificado a 5 mg/ml; 6) incubando durante 1 hora a 37°C; 7) aplicando un anticuerpo anti-C4 marcado con Eu; 8) aplicando una solución de potenciación; y 9) leyendo la Eu por fluorometría de resolución temporal. Entre cada etapa la placa se incubaba a temperatura ambiente y se lava, excepto entre las etapas 8 y 9.

Se puede llevar a cabo una estimación por ELISA de forma similar, por ejemplo aplicando un anti-C4 marcado con biotina en la etapa 7; 8) aplicando avidina marcada con fosfatasa alcalina; 9) aplicando el sustrato; y 10) leyendo la intensidad del color.

La funcionalidad se puede expresar como la actividad específica de MBL, como 1 unidad de actividad de MBL por ng de MBL. Una MBL no funcional se puede definir como una MBL que tiene una actividad específica menor del 50% de la actividad específica de la MBL plasmática, como menor del 25% de la actividad específica de la MBL plasmática, en la que la MBL plasmática es purificada a partir de un individuo que no presenta ninguna mutación en la MBL. En particular, la MBL plasmática de referencia es la mezcla de plasma LJ 6.57 28/04/97.

Así, la presente invención también se refiere a la prevención y/o tratamiento de infecciones en individuos que tienen una mutación en el gen de la MBL que lleva a una expresión disminuida de MBL y/o expresión de MBL no funcional.

5 En particular, dichas mutaciones en el gen de la MBL pueden llevar a un cambio en el aminoácido número 52 (la numeración incluye el péptido líder), de arginina a cisteína, en el aminoácido 54, de glicina a ácido aspártico, o en el aminoácido número 75, de glicina a ácido glutámico.

10 Mutaciones en la región promotora del gen de la MBL también pueden llevar a niveles disminuidos de MBL. En particular, mutaciones en la posición - y en la posición -221 influyen en la expresión de MBL.

La secuencia de la MBL se puede encontrar en swiss.prot con el número de registro 11226.

15 La composición de MBL usada para fabricar un medicamento de MBL se puede generar a partir de cualquier fuente de MBL disponible. La fuente de MBL puede ser MBL natural, para lo cual las MBL se producen en un organismo huésped nativo, lo que significa que la MBL es producida por una célula que normalmente expresa MBL. Un método habitual para fabricar una composición de MBL es mediante la extracción de MBL de fluidos corporales humanos, como suero o plasma, pero la MBL también se puede recoger a partir de cultivos de hepatocitos.

20 En otro aspecto, los oligómeros de la MBL son producidos por un organismo huésped que no expresa de forma nativa un polipéptido de MBL, como por tecnología recombinante.

25 En una primera forma de realización, la fuente de MBL puede ser suero, a partir del cual se obtiene una composición de MBL pasando por la purificación del suero, plasma, productos lácteos, calostro o similares mediante un método de purificación adecuado, como la cromatografía de afinidad, usando matrices ligadas a hidratos de carbono, como matrices acopladas a manosa o manano. Se habla de dicho método en el documento WO99/64453, en el que el procedimiento de purificación está seguido de una etapa de eliminación de virus con objeto de eliminar los agentes infecciosos de la fuente de MBL, ya que uno de los problemas principales con las proteínas purificadas a partir de fluidos corporales es el riesgo de introducir agentes infecciosos junto con la proteína deseada. El documento WO99/64453 se incorpora por la presente memoria descriptiva como referencia.

30 La composición de MBL usada para fabricar un medicamento de MBL comprende preferiblemente oligómeros de la MBL con una distribución de tamaño sustancialmente idéntica a la distribución de tamaño de la MBL en el suero, como un perfil de distribución de tamaño idéntico al menos en un 50% al perfil de distribución de tamaño de la MBL en suero. Por idéntico se entiende que al menos el 50% de los oligómeros tiene un peso molecular aparente mayor de 200 kDa cuando se analiza por SDS-PAGE y/o hibridación tipo Western.

35 En una forma de realización más preferida, el perfil de distribución de tamaño es idéntico al menos en un 75% al perfil de distribución de tamaño de la MBL en suero, como idéntico en al menos el 90% al perfil de distribución de tamaño de la MBL en suero, y se prefiere más aun que sea idéntico en al menos el 95% al perfil de distribución de tamaño de la MBL en suero.

40 Cuando se purifica a partir de una fuente de MBL que tiene inicialmente otro perfil de distribución de tamaño se prefiere que la cromatografía de afinidad usada para purificar a partir de la fuente de MBL favorezca la purificación de oligómeros que tengan un peso molecular aparente mayor de 200 kDa. Esto se obtiene usando una matriz ligada a hidratos de carbono sin una afinidad sustancial por las subunidades y/o los dímeros de la MBL. Preferiblemente, la matriz ligada a hidratos de carbono tiene afinidad sustancialmente sólo por la MBL recombinante, tetramérica, pentamérica y/o hexamérica.

50 La matriz se puede ligar a cualquier hidrato de carbono, o a una mezcla de hidratos de carbono, al que se une la MBL y para lo cual está favorecida la unión de los oligómeros mayores de la MBL. La matriz ligada a hidratos de carbono es preferiblemente una matriz ligada a hexosa, como una matriz ligada a manosa o N-acetil-glucosamina, como más preferiblemente una matriz ligada a manosa.

55 La selectividad de la matriz ligada a hidratos de carbono se obtiene asegurándose de que la matriz en sí, es decir, la matriz sin ligar a hidratos de carbono, no tenga sustancialmente afinidad por los polipéptidos de MBL; que en particular no tenga afinidad por trímeros u oligómeros más pequeños de la MBL. Esto se puede asegurar cuando la matriz en sí está libre de hidratos de carbono. En particular, la matriz no debería contener ninguna Sefarosa o similar. Se prefiere que la matriz consista en un material polímero que no contenga hidratos de carbono, como bolas de Fractogel®TSK.

60 La matriz se puede encontrar en cualquier forma adecuada para la cromatografía, sobre todo en forma de bolas, como bolas de plástico.

65 Tras la aplicación de la fuente de MBL, la columna se lava, usando preferiblemente tampones no desnaturalizantes, con una composición, pH y fuerza iónica que tengan como resultado la eliminación de proteínas, sin eluir los oligómeros mayores de la MBL. Así el tampón puede ser TBS. La elución de la MBL se realiza con un agente desorbente selectivo, capaz de eluir de forma eficaz los polímeros mayores de la MBL, como TBS con un agente desorbente, como EDTA (por ejemplo, EDTA 5 mM) o manosa (por ejemplo, manosa 50 mM), y los oligómeros de la MBL se recogen.

Este método de purificación está descrito en la solicitud de patente internacional pendiente de tramitación que tiene como título "Recombinant Human Mannan Binding Lectin" depositada el mismo día que la presente solicitud.

En un aspecto preferido, una composición de MBL de calidad clínica se obtiene usando una fuente de MBL generada por tecnología recombinante, en la que la fuente de MBL es el medio de cultivo procedente del cultivo de células productoras de MBL.

Así, la presente invención abarca MBL producida por un procedimiento de producción de lectina de unión a manano (MBL) recombinante, que comprende las etapas de:

- preparación de una construcción para la expresión génica que comprende una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de MBL o un equivalente funcional del mismo,
- la transformación de un cultivo de células huésped con la construcción,
- el cultivo de las células huésped, obteniendo así la expresión y la secreción del polipéptido al medio de cultivo, seguido de
- la obtención de un medio de cultivo que comprende MBL humana recombinante.

El medio de cultivo que comprende los polipéptidos de MBL humana recombinante se puede entonces procesar tal como se ha descrito más arriba para la purificación de MBL.

El polipéptido de MBL es preferiblemente un polipéptido de MBL de mamífero, más preferiblemente un polipéptido de MBL humana. La construcción para la expresión génica se puede generar por métodos convencionales conocidos por un experto en la materia, como el que se describe en la patente de Estados Unidos número 5.270.199.

En otra forma de realización, la construcción para la expresión génica se prepara tal como se describe en la solicitud de patente danesa número PA 1999 00668 o en la solicitud de patente internacional pendiente de tramitación que tiene como título "Recombinant Human Mannan Binding Lectin" depositada el mismo día que la presente solicitud.

La expresión se lleva a cabo, preferiblemente, por ejemplo, en células de mamífero; la preparación de acuerdo con la presente invención resulta del uso de un vector de expresión que comprende una(s) secuencia(s) intrón de un gen de la MBL y al menos una secuencia exón. Respecto a los animales transgénicos como sistemas de expresión este término, en este contexto, se refiere a animales que han sido genéticamente modificados para contener y expresar el gen humano de la MBL o fragmentos o miméticos del mismo.

Además del método de purificación, se prefiere que la construcción para la expresión génica y la célula huésped también favorezcan la producción de oligómeros mayores, lo cual se ha visto que es posible usando una construcción para la expresión génica que comprende al menos una secuencia intrón del gen de la MBL humana o un equivalente funcional del mismo.

En particular, la composición de MBL se usa para el tratamiento y/o la profilaxis de una infección asociada a un estado de inmunocompromiso en un individuo. Cualquier infección microbiana puede ser tratada y/o prevenida con MBL, es decir, cualquier infección causada por una especie microbiana.

Por consiguiente, la composición de MBL se puede usar para prevenir y/o tratar una infección en un individuo inmunocomprometido en la que la especie microbiana es un hongo, una levadura, un protozoo y/o una bacteria.

La composición de MBL se puede usar también para tratar una infección en la que la especie microbiana es resistente a los medicamentos habituales, como infecciones en las cuales la especie bacteriana es resistente a al menos un medicamento antibiótico. Más importante es la profilaxis y/o tratamiento de infecciones en las cuales la especie bacteriana es multirresistente.

Los individuos inmunocomprometidos pueden sufrir infecciones causadas por especies bacterianas patógenas, como *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella* y especies de *Staphylococcus*.

Se sabe, sin embargo, que los individuos inmunocomprometidos, en particular, sufren a menudo infecciones causadas por especies bacterianas que normalmente no son patógenas, es decir, patógenos oportunistas, como por ejemplo especies de *E. coli*, y muchas de estas especies son resistentes al tratamiento antibiótico habitual.

La infección asociada al estado de inmunocompromiso también puede ser una infección viral, como una infección viral en la que el virus es un retrovirus.

También, el estado de inmunocompromiso puede ser una infección por el retrovirus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Sin embargo, las infecciones virales tratadas y/o prevenidas de acuerdo con la invención no son normalmente causadas por un retrovirus, sino que pueden ser causadas por ejemplo por un virus ADN.

El medicamento se puede fabricar usando el eluyente obtenido de la cromatografía de afinidad como tal. Se prefiere, sin embargo, que el eluyente sea sometido a posteriores etapas de purificación antes de ser usado.

Además de los oligómeros de la MBL, el medicamento puede comprender una sustancia vehículo y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. En particular, se puede añadir un agente estabilizante para estabilizar las proteínas MBL. El agente estabilizante puede ser un azúcar-alcohol, sacáridos, proteínas y/o aminoácidos. Ejemplos de agentes estabilizantes pueden ser la maltosa o la albúmina.

Se pueden añadir otros aditivos convencionales al medicamento dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración. En una forma de realización, el medicamento se encuentra en una forma adecuada para inyecciones. Se pueden usar sustancias vehículo convencionales, como salino isotónico.

En otra forma de realización, el medicamento se encuentra en una forma adecuada para su administración pulmonar, como en forma de polvos para su inhalación o crema o fluido para su aplicación tópica.

La vía de administración puede ser cualquier vía adecuada, como intravenosa, intramuscular, subcutánea o intradérmica. La presente invención también contempla la administración pulmonar o tópica.

La composición de MBL también se puede administrar simultáneamente, de forma secuencial o separada, con otro tratamiento, dando como resultado dicho otro tratamiento un estado de inmunocompromiso en el individuo, como, por ejemplo, la quimioterapia. El medicamento se puede administrar durante un periodo antes del comienzo de la administración de la quimioterapia o similar y durante al menos una parte de la quimioterapia.

La composición de MBL se administra en regímenes de dosis adecuados; en particular, se administra repetidamente en intervalos adecuados, como una o dos veces por semana, empezando antes del comienzo de la quimioterapia y manteniéndola por intervalos, por ejemplo, una vez a la semana, al menos durante una parte del periodo de quimioterapia, preferiblemente durante todo el periodo de quimioterapia.

Normalmente se administran 1-100 mg por dosis, como 2-10 mg, sobre todo 5-10 mg por dosis dependiendo del individuo que se ha de tratar; por ejemplo, se administran aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal.

El uso de una composición de MBL también puede formar parte de un kit con distintas partes que comprende además otro medicamento, como un medicamento antifúngico, antilevadura, antibacteriano y/o antiviral.

El medicamento antiviral puede ser un medicamento capaz de atenuar el virus y/o eliminarlo.

La invención también se refiere a un aspecto acerca del uso de una determinación del nivel de MBL como marcador pronóstico del riesgo en el individuo de adquirir una infección y como indicador de la necesidad de tratamiento. En particular, un nivel de MBL por debajo de 500 ng/ml es un marcador pronóstico que indica el tratamiento con MBL, en particular, en un individuo inmunocomprometido o un individuo con riesgo de inmunocompromiso.

El marcador pronóstico puede estar en relación con cualquier infección, pero es especialmente relevante como marcador pronóstico de septicemia o neumonía en individuos sometidos a un tratamiento citotóxico inmunosupresor.

Así, la presente invención también se refiere a un método para usar una composición de MBL para prevenir y/o reducir las infecciones en un individuo, comprendiendo el método las etapas de:

i) determinación de los niveles séricos de MBL en un individuo,

ii) estimación de la probabilidad de aparición de una infección clínicamente significativa en el individuo, y eventualmente,

la administración de una composición de MBL al individuo.

El nivel de MBL se mide en suero o plasma, y se puede determinar mediante un ensayo inmunofluorométrico de resolución temporal (TRIFMA), ELISA, RIA o nefelometría.

Los niveles de MBL también se pueden deducir del análisis de los genotipos de los genes de MBL tal como se ha comentado más arriba, en relación con mutaciones de MBL que llevan a una disminución del nivel de MBL.

La invención se ha explicado y justificado en varios aspectos y con los detalles adecuados, pero se ilustrará además a continuación con las figuras 1 y 2 y los ejemplos no limitantes de formas de realización preferidas.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Distribución de las concentraciones de MBL en el plasma de pacientes con leucemia dividida en pacientes con infecciones clínicamente significativas (CSI) y pacientes sin CSI.

Figura 2: Distribución de las concentraciones de MBL en el plasma de pacientes con mieloma múltiple dividida en pacientes con infecciones clínicamente significativas (CSI) y pacientes sin CSI.

Ejemplo

El siguiente ejemplo demuestra los resultados de un estudio acerca de la influencia de la deficiencia de MBL en la aparición de infecciones clínicamente significativas en un grupo de individuos hematológicos sometidos a quimioterapia.

Población del estudio

El estudio abarca el seguimiento de una serie consecutiva de pacientes que acuden a Servicio de Hematología, Universidad de Aarhus, Dinamarca. La mayoría de estos pacientes recibió quimioterapia. Se incluyeron 7 con leucemia aguda mieloide, 17 con mieloma múltiple (MM), 11 con policitemia, 13 con linfoma no Hodgkin, 1 con linfoma Burkitt, 1 con macroglobulinemia de Waldenström, 5 con leucemia linfática crónica, 3 con gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS), 5 con enfermedad de Hodgkin, 2 con leucemia mieloide crónica, 1 con leucemia aguda linfóide, 1 con anemia aplásica y 1 con mielofibrosis. En cuanto al grupo de MM, todos recibieron quimioterapia. Se usaron tres tratamientos diferentes; VAD: vincristina (0,4 mg/24 h) y doxorubicina (Adriamicina) (9 mg por m²/24 h) administrado en infusión continua durante 4 días y dexametasona (40 mg, p.o.) durante 4 días de los días 1 a 4, 9 a 12 y 17 a 20 de cada ciclo de 28 días; NOP: mitoxantrone (10 mg por m²) y vincristina (1,4 mg por m²) administrado en infusión continua una vez y prednisona (2 x 50 mg, p.o.) cada día del cada ciclo; MP: melfalán (0,25 mg/kg/día) en infusión durante 4 días y prednisona (2 x 50 mg, p.o.) durante 4 días.

Los pacientes que presentaban infecciones clínicamente significativas (CSI, definidas como bacteriemia o neumonía) se identificaron mediante una búsqueda informática retrospectiva en la base de datos del paciente. De los pacientes con MM y con CSI, 4 tuvieron una neumonía neumocócica, 3 tuvieron una neumonía no especificada y 1 tuvo neumonía por *Staphylococcus aureus*.

Antes de iniciar la quimioterapia, se extrajo sangre en tubos de cristal al vacío que contenían EDTA (concentración final de 10 mM aproximadamente). El plasma se alicuotó y se conservó a -80°C hasta el ensayo. Se obtuvieron muestras de plasma de forma similar de donantes de sangre sanos. En el momento de la extracción de la muestra de sangre los pacientes estaban libres de infecciones.

Ensayo para MBL

La concentración de MBL se determinó mediante un ensayo inmunofluorométrico de resolución temporal (TRIF-MA). Se revistieron los pocillos de una placa de microvaloración (fluoroNunc, Nunc, Kamstrup, Dinamarca) con un anticuerpo, incubándolos durante toda la noche a temperatura ambiente con 500 ng de anticuerpo anti-MBL humana (Mab 131-1, Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca) en 100 µl de PBS (NaCl 0,14 M, fosfato 10 mM, pH 7,4). Tras lavar con un tampón que contenía Tween (TBS, NaCl 0,14 M, Tris/HCl 10 mM, Na₂S₂O₃ 7,5 mM, pH 7,4 con Tween 20 al 0,05%), las diluciones de las muestras del ensayo (plasma 1/20) y de los calibradores se añadieron a TBS/Tween con NaCl añadido hasta 0,5 M y EDTA 10 mM.

Tras la incubación durante toda la noche a 4°C y un lavado, se añadió el anticuerpo de revelado marcado con europio (12,5 ng Mab 131-1 marcado con el quelato de Eu, el ácido isotiocianato-benzoil-dietilen-triimina-tetra acético, de acuerdo con el fabricante, Wallac, Turku, Finlandia) en TBS/Tween con EDTA 25 µM.

Tras una incubación de 2 h y un lavado, se añadió una solución de potenciación de la fluorescencia (Wallac) y las placas se leyeron en un fluorímetro de resolución temporal (Delfia 1232, Wallac). La curva de calibración se hizo usando diluciones de un plasma, que se conservó alicuotado a -80°C. La concentración de MBL en este plasma (3,6 µg/ml) se determinó comparándola con MBL altamente purificada, que se cuantificó mediante un análisis cuantitativo de aminoácidos.

Resultados

No se encontró diferencia entre el número de individuos con una deficiencia de MBL entre los pacientes hematológicos y las personas normales.

Se observó un nivel significativamente menor de MBL en pacientes hematológicos con CSI comparado con los pacientes sin CSI (Fig. 1). Si se analiza el grupo de pacientes con MM por separado, se observa un nivel menor de MBL entre los paciente con CSI (Fig. 2).

Discusión

Hasta ahora los estudios sobre la correlación entre la deficiencia de MBL y la frecuencia de infecciones se han llevado a cabo definiendo un nivel arbitrario para la deficiencia (por ejemplo, 50 ng/ml¹⁸) o usando la presencia de mutaciones alélicas de MBL en ambos cromosomas como indicador de deficiencia^{11,12}. En el presente estudio, los propios individuos definen el nivel en el que aparecen los síntomas clínicos, siendo por debajo de 500 ng de MBL

por ml. En otros grupos de pacientes, se puede demostrar que el nivel es diferente, ya que los distintos parámetros inmunológicos tendrán una importancia variable en distintas poblaciones de pacientes.

Los resultados mostrados en las Figuras 1 y 2 ilustran que los pacientes con una concentración de MBL en plasma menor de 500 ng/ml son mucho más susceptibles a las infecciones tras un tratamiento quimioterápico. Se debería ofrecer a este grupo de pacientes una terapia sustitutiva con MBL durante sus tratamientos quimioterápicos. Este tratamiento se puede iniciar antes de comenzar el tratamiento quimioterápico y ser mantenido hasta que los demás parámetros inmunológicos se hayan normalizado. La MBL se podría preparar a partir de plasma humano o se podría generar por tecnología recombinante.

Evidentemente, uno puede prever que los pacientes con otras formas de cáncer sometidos a un tratamiento citotóxico (quimioterapia o radioterapia con rayos X) deberían beneficiarse también del tratamiento con MBL.

Unos resultados no publicados han mostrado una disminución en las concentraciones de MBL tras una septicemia y el tratamiento con MBL podría así demostrar una modalidad útil en pacientes que presentan primero niveles normales de MBL.

La duración de la supervivencia de los pacientes con MM varía entre unos pocos meses y muchos años. Se han invertido esfuerzos considerables para conseguir definir parámetros pronósticos de la supervivencia de pacientes con cáncer sometidos a quimioterapia.

Los resultados presentados demuestran que la concentración de MBL es un indicador excelente de sepsis tras la quimioterapia. La determinación de la concentración de MBL es por lo tanto un importante parámetro pronóstico en pacientes sometidos a quimioterapia y se supone que debe ser similar en pacientes designados para otros tratamientos terapéuticos citotóxicos. Ya que los genotipos del gen de la MBL determinan la concentración plasmática de MBL, se puede usar un análisis de los genes de MBL para estimar indirectamente la concentración de MBL en individuos.

En la bibliografía dos estudios han incluido determinaciones de MBL en pacientes con cáncer. Aittoniemi y col., analizaron pacientes con leucemia linfática crónica (LLC) para el estudio de una asociación entre la deficiencia de MBL y las infecciones²⁵. Solamente seis de entre 28 pacientes recibieron quimioterapia, tres pacientes recibieron clorambucil-[prednisolona], y los otros tres recibieron clorambucil-[prednisolona] y ciclofosfamida-(hidroxidaunorrubicina)-oncovina-prednisolona. La deficiencia de MBL se definió como una concentración de MBL por debajo del límite de detección (<20 ng/ml) del ensayo de MBL usado. De los 28 pacientes, solamente uno se incluyó en el grupo con deficiencia de MBL.

No se intentó analizar la asociación entre los niveles de MBL y la tasa de infecciones en los pacientes que habían recibido quimioterapia. Así, no se pueden sacar conclusiones de ese estudio en relación con las reivindicaciones de la presente solicitud de patente.

Lehmbecher y col. estudiaron si el nivel de interleucina-6, interleucina-8, proteína C reactiva, receptor gamma Fc tipo III soluble o MBL podían ser indicadores de infecciones severas en niños con fiebre con cáncer y neutropenia²⁶. Se estudió un total de 56 niños con una enfermedad maligna confirmada y neutropenia inducida por quimioterapia. Los niveles determinados de MBL no se presentaron, en realidad, en el artículo. Solamente se indica en el texto que "el nivel de MBL no fue útil para la discriminación entre infecciones que comprometen la vida y episodios febriles sin una fuente identificables o probables bacteriemias asociadas a catéter".

El grupo de estudio, en este estudio, es diferente del que se presenta en la presente solicitud de patente ya que eran todo niños y 27 de los niños se incluyeron por la presencia de un tumor sólido y no de una leucemia. Los 29 pacientes con leucemia restantes no se analizan en sí. Sin los datos reales no es posible comparar este estudio con los resultados presentados en esta memoria descriptiva.

Se han usado otros agentes biológicos e inmunomoduladores en el tratamiento de pacientes con neutropenia y fiebre. La inmunoglobulina intravenosa no ejerce ningún beneficio sobre la prevención de fiebre o infecciones en pacientes con neutropenia, pero puede tener un efecto moderado en pacientes con deficiencias de anticuerpos. El interferón gamma puede ejercer un beneficio en los pacientes con algunas deficiencias de neutrófilos, pero esto no se ha probado definitivamente. Los factores de crecimiento celulares (factores estimulantes de colonias de granulocitos y granulocitos-macrófagos) pueden acortar la duración de la neutropenia y así la necesidad de antibióticos.

Bibliografía

1. **Weis WI, Taylor ME and Drickamer K (1998).** The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunological Reviews* 163: 19-34.

2. **Holmskov, U., Malhotra, R., Sim, R.B., and Jensenius, J.C. (1994)** Collectins: Collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol. Today* 15: 67-74.

3. **Turner, M.W. (1996)** Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol. Today* 17: 532-540.

4. **Janeway CA, Travers P, Walport M and Capra JD (1999)** Immunobiology, the immune system in health and disease, Fourth edition, Churchill Livingstone.

5. **Matsushita, M. and Fujita, T (1992).** Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with novel C1s-like serine protease. *J. Exp. Med.* 176: 1497-1502.

6. **Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaebler W, Laursen SB, Poulsen K, Willis AC, Eggleston P, Hansen S, Holmskov U, Reid KB and Jensenius JC (1997)** A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature*, 386 (6624): 506-510.

7. **Stover CM, Thiel S, Thelen M, Lynch NJ, Vorup-Jensen T, Jensenius JC and Schwaebler WJ (1999)** Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structure gene. *J. Immunol.* 162: 3481-3490.

8. **Thiel S, Holmskov U, Hviid L, Laursen SB and Jensenius JC (1992)** The concentration of the C-type lectin mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin. Exp. Immunol.* 90: 31-35.

9. **Madsen, H.O., Garred, P., Kurtzhals, J.A., Lamm, L.U., Ryder, L.P., Thiel, S., and Svejgaard, A. (1994)** A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* 40: 37-44.

10. **Summerfield JA, Ryder S, Sumiya M, Thursz M, Gorchein A, Montell MA and Turner MW (1995)** Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* 345: 886-889.

11. **Garred P, Madsen HO, Hofmann B and Svejgaard A (1995)** Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan binding protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. *Lancet* 346: 941-943.

12. **Summerfield JA, Sumiya M, Levin M and Turner MW (1997)** Association of mutations in mannose-binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *BioMed. J.* 314: 1229-1232.

13. **Van Emmerik, LC, Kuijper, EJ, Fijen, CAP, Dankert, J, and Thiel, S (1994)** Bonding of mannan-binding protein to various bacterial pathogens of meningitis. *Clin. Exp. Immunol.* 97: 411-416.

14. **Jack DL, Dodds AW, Anwar N, Ison CA, Law A, Frosch M, Turner MW and Klein NJ (1998)** Activation of complement by Mannose-binding lectin on isogenic mutants of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J. Immunol.* 169: 1346-1353.

15. **Miller, M.E., Seals, J., Kaye, R., and Levitsky, L.C. (1968)** A familial, plasma-associated defect of phagocytosis. A new case of recurrent bacterial infections. *The Lancet*: 60-63.

16. **Super, M., Thiel, S., Lu, J., Levinsky, R.J., and Turner, M.W. (1989)** Association of low levels of mannose-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet* 2: 1236-1239.

17. **Nielsen, S.L., Andersen, P.L., Koch, C., Jensenius, J.C., and Thiel, S. (1995)** The level of the serum opsonin, mannan-binding protein in HIV-1 antibody-positive patients. *Clin. Exp. Immunol.* 100: 219-222.

18. **Christiansen, O.B., Kilpatrick, D.C., Souter, V., Varming, K., Thiel, S., Jensenius, J.C. (1999)** Mannan-binding lectin deficiency is associated with unexplained recurrent miscarriage. *Scand. J. Immunol.* 49: 193-196.

19. **Garred, P, Harboe, M, Oettinger, T, Koch, C, and Svejgaard, A (1994)** Dual role of mannan binding protein in infections: Another case of heterosis? *Eur. J. Immunogen.* 21: 125-131.

20. **Hoal-Van Helden EG, Epstein J, Victor TC, Hon D, Lewis LA, Beyers N, Zurakowski D, Ezekowitz AB, Van Helden PD (1999)** Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis. *Pediatr. Res.* 45: 459-64.

21. **Fischer, PB, Ellerman-Eriksen, S, Thiel, S, Jensenius, JC, and Mogensen, SC (1994)** Mannan-binding protein and conglutinin mediate enhancement of herpes simplex virus type-2 infection in mice. *Scand. J. Immunol.* 39:429-445.

22. **Valdimarsson H, Stefansson M, Vikingsdottir T, Arason GJ, Koch C, Thiel S and Jensenius JC (1998)** Reconstitution of opsonizing activity by infusion of mannan-binding lectin (MBL) to MBL-deficient humans. *Scand. J. Immunol.* 48: 116-123.

24. **Pizzo PA (1993)**, Management of fever in patients with cancer and treatment-induced neutropenia. *N. Eng. J. Med.* 328: 1323-1332.

25. **Aittoniemi, J., Miettinen, A., Laine, S., Sinisalo, M., Laippala, P., Vilpo, J.** (1999). Opsonising immunoglobulins and mannan-binding lectin in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* Jul; 34(34): 3815.

26. **Lehmbecher T, Venzon D, de Haas M, Chanock SJ, Kuhl J.** (1999) Assessment of measuring circulating levels of interleukin6, interleukin8, C reactive protein, soluble Fc gamma receptor type III, and mannose binding protein in febrile children with cancer and neutropenia. *Clin. Infect. Dis.* Aug; 29(2): 4149.

27. **Lu, J., Thiel, S., Wiedemann, H., Timpl, R. & K.B.M. Reid** (1990) Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r₂C1s₂ complex, of the classical pathway of complement without involvement of C1q. *J. Immunol.* 144: 2287-2294.

28. **Sastry, K., Herman, G.A., Day, L., Deignan, E., Bruns, G., Morton, C.C. & R.A.B. Ezekowitz** (1989) The human mannose-binding protein gene. *J. Exp. Med.* 170: 1175-1189.

29. **Lipscombe, R.J., Sumiya, M., Sunnerfield, J.A. & M.W. Turner** (1995) Distinct physicochemical characteristics of human mannose-binding protein expressed my individuals of differing genotype. *Immunology* 85:660-667.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende al menos una subunidad de lectina de unión a manano (MBL), o al menos un oligómero de la lectina de unión a manano (MBL) que comprende la al menos una subunidad de lectina de unión a manano (MBL), en la fabricación de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de una infección en un individuo que tiene un nivel sérico de MBL superior a 50 ng/ml de suero.
2. Uso de la reivindicación 1, en el que la composición comprende al menos un oligómero de la lectina de unión a manano (MBL) que comprende la al menos una subunidad de lectina de unión a manano (MBL).
3. Uso de la reivindicación 2, en el que dicho oligómero se selecciona preferiblemente del grupo de oligómeros formado por tetrámeros, pentámeros y/o hexámeros.
4. Uso de la reivindicación 1, en el que el individuo tiene está en un estado inmunocomprometido.
5. Uso de la reivindicación 4, en el que dicho estado de inmunocompromiso es una neutropenia.
6. Uso de la reivindicación 1, en el que la infección es una infección causada por una especie microbiana.
7. Uso de la reivindicación 6, en el que la especie microbiana es un hongo.
8. Uso de la reivindicación 6, en el que la especie microbiana es una levadura.
9. Uso de la reivindicación 6, en el que la especie microbiana es una bacteria.
10. Uso de la reivindicación 9, en el que la especie bacteriana es patogénica.
11. Uso de la reivindicación 6, en el que la infección es una infección viral.
12. El uso de la reivindicación 1, en el que la subunidad de MBL o el oligómero de la MBL es producido en un organismo huésped nativo.
13. El uso de la reivindicación 1, en el que la subunidad de MBL o el oligómero de la MBL es producido por un organismo huésped no humano que no expresa de forma nativa un polipéptido de MBL.
14. El uso de la reivindicación 1, en el que la subunidad de MBL o el oligómero de la MBL es producido por un método que comprende al menos una etapa de tecnología de ADN recombinante *in vitro*.
15. El uso de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que la producción de la subunidad de MBL o del oligómero de la MBL está controlada por una secuencia control de expresión que no está asociada de forma nativa a la expresión del polipéptido de MBL.
16. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que la subunidad de MBL o el oligómero de la MBL se aísla mediante un método que comprende al menos una etapa que implica una cromatografía de afinidad.
17. El uso de la reivindicación 16, en el que la etapa de cromatografía de afinidad es capaz de aislar tetrámeros, pentámeros y/o hexámeros de MBL de una composición que comprende además oligómeros de la MBL y/o subunidades de la MBL adicionales.
18. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en el que la subunidad de MBL y/o el oligómero de la MBL está libre de cualquier impureza asociada de forma natural a la MBL cuando se produce en un organismo huésped nativo.
19. El uso de la reivindicación 1, en el que la subunidad de MBL es una subunidad de MBL de mamífero.
20. EL uso de la reivindicación 19, en el que la subunidad de MBL de mamífero es una subunidad de MBL humana.
21. El uso de la reivindicación 1, en el que el individuo tiene niveles séricos de MBL inferiores a 500 ng/ml.
22. El uso de la reivindicación 1 ó 21, en el que los niveles séricos de MBL del individuo han sido determinados mediante análisis cuantitativo.
23. Uso de una composición que comprende al menos una subunidad de lectina de unión a manano (MBL), o al menos un oligómero de la lectina de unión a manano (MBL) que comprende la al menos una subunidad de lectina de unión a manano (MBL) y el uso de un medicamento antimicrobiano para la preparación de un medicamento en forma de kit con distintas partes, comprendiendo dicho medicamento en forma de kit con distintas partes al menos una subunidad de lectina de unión a manano (MBL), o al menos un oligómero de la lectina de unión a manano (MBL) que

ES 2 271 468 T3

comprende la al menos una subunidad de lectina de unión a manano (MBL) y el medicamento antimicrobiano, para la profilaxis y/o tratamiento de una infección en un individuo que tiene un nivel sérico de MBL superior a 50 ng/ml de suero.

- 5 24. El uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que el medicamento antimicrobiano es un medicamento antibacteriano.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

Niveles de MBL en pacientes hematológicos

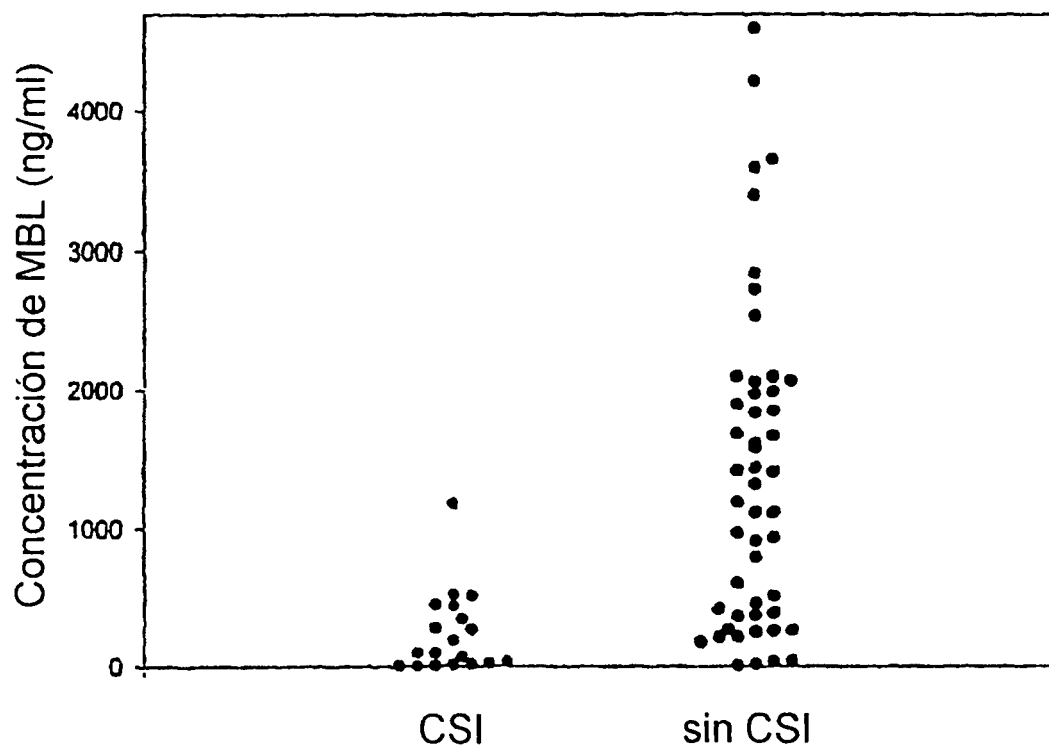


Fig. 2

Niveles de MBL en mieloma múltiple

