

MOLÉCULAS DE FUSIÓN

I. CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere a moléculas de fusión que tienen especificidad de unión para pioverdina tipo I, II y III y pioquelina y pueden usarse en varias aplicaciones, incluyendo aplicaciones de diagnóstico y/o terapéuticas, por ejemplo, para inhibir o reducir el crecimiento de *P. aeruginosa* y/o para prevenir o tratar una infección por biopelícula de *P. aeruginosa* así como enfermedades o trastornos asociados con una infección por biopelícula de *P. aeruginosa*. La presente invención también se refiere a métodos para producir las moléculas de fusión descritas en la presente memoria así como a composiciones y kits que comprenden dichas moléculas de fusión. La presente invención se refiere además a moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de fusión descritas en la presente memoria.

15

II. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es un patógeno oportunista que causa infecciones agudas, principalmente en asociación con lesiones tisulares. *P. aeruginosa* forma biopelículas en dispositivos internos y en los tejidos pulmonares de pacientes con el trastorno genético, fibrosis quística. Las infecciones por biopelícula son difíciles de tratar con terapias de antibiótico convencionales. Sin embargo, la investigación ha demostrado que el hierro es esencial para la formación apropiada de biopelículas por *P. aeruginosa*, y por lo tanto los sistemas de captación de hierro son dianas potenciales para terapias anti-*Pseudomonas*.

25

P. aeruginosa es capaz de secuestrar hierro del entorno del huésped usando los sideróforos de unión a hierro secretados, pioquelina y pioverdina. La pioverdina (Pvd) es un ligando de tipo hidroxamato y catecolato unido a péptido, y la pioquelina (Pch) un conjugado derivatizado de salicilato y dos moléculas de cisteína y que tiene funcionalidades de ligando fenol, carboxilato, y amina. Tanto Pvd como Pch han demostrado papeles en la virulencia de *P. aeruginosa* con alguna indicación de sinergismo. Los mutantes deficientes dobles incapaces de sintetizar ninguno de los dos sideróforos tienen una virulencia mucho más atenuada que cualquiera de los mutantes deficientes simples incapaces de sintetizar sólo uno de los dos sideróforos (Takase et al., Infection and immunity, abr.2000, p.1834-1839). Además, la pioverdina actúa como una molécula de señalización para controlar la producción de varios factores de virulencia así como pioverdina en sí misma; mientras se ha propuesto que pioquelina puede ser parte de un sistema para obtener metales divalentes tales como hierro ferroso y cinc para la patogenicidad de *P. aeruginosa*, además de hierro férrico (Visca et al., 1992).

35

Se han identificado tres tipos o grupos de pioverdina estructuralmente diferentes a partir de varias cepas de *P. aeruginosa*: a partir de *P. aeruginosa* ATCC 15692 (Briskot et al., 1989, Liebigs Ann Chem, p.375-384), a partir de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Tappe et al., 1993, J.Prakt-Chem., 335, p.83-87) y a partir de un aislado natural, *P. aeruginosa* R (Gipp et al., 1991, Z. Naturforsch, 46c, p.534-541). Además, las investigaciones biológicas comparativas en 88 aislados clínicos y las dos cepas de colección mencionadas anteriormente revelaron tres sistemas diferentes de captación de hierro mediados por pioverdina específicos de cepa (Cornells et al., 1989, Infect Immun., 57, p.3491-3497; Meyer et al., 1997, Microbiology, 143, p.35-43) según las cepas de referencia: *P. aeruginosa* ATCC 15692 (Pvd Tipo I o Pvd I), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Pvd Tipo II o Pvd II) y los aislados clínicos *P. aeruginosa* R y pa6 (Pvd Tipo III o Pvd III).

Cada tipo de pioverdina tiene tres miembros (subtipos) que se diferencian en la cadena lateral que es succinilo, succinamida o α -cetoglutarilo, concretamente, Pvd tipo I succinilo, Pvd tipo I succinamida, Pvd tipo I α -cetoglutarilo, Pvd tipo II succinilo, Pvd tipo II succinamida, Pvd tipo II α -cetoglutarilo, Pvd tipo III succinilo, Pvd tipo III succinamida y Pvd tipo III α -cetoglutarilo.

Cada cepa de *P. aeruginosa* expresa un tipo de Pvd, es decir, *P. aeruginosa* ATCC 15692 expresa Pvd Tipo I, *P. aeruginosa* ATCC 27853 expresa Pvd Tipo II y *P. aeruginosa* R y pa6 expresan Pvd Tipo III, mediante lo cual cada tipo de Pvd incluye los tres miembros del tipo respectivo, y cada una de dichas cepas también expresa pioquelina.

Los inventores han identificado las pioverdinas y pioquelina como dianas que son cruciales para la patogenicidad de *P. aeruginosa* y desarrollaron inhibidores específicos para dichas dianas, es decir, para cada tipo de Pvd incluyendo para cada tipo los tres miembros (subtipos) que se diferencian en la cadena lateral (Pvd I s, Pvd I sa, Pvd I α KG, Pvd II s, Pvd II sa, Pvd II α KG, Pvd III s, Pvd III sa, Pvd III α KG) así como para Pch, y en cada caso para el sideróforo libre así como el sideróforo con hierro unido sin crear la presión selectiva fuerte impuesta por antibióticos convencionales (véase también EP 15 305 242.8).

Se cree que el modo de crecimiento en biopelícula es crítico para infecciones persistentes de *P. aeruginosa* (Costerton et al., 1999; Singh et al., 2000) y la expresión dual de los genes de Pvd y Pch es necesaria para el desarrollo normal de biopelícula (Banin et al., 2005). Dado que *P. aeruginosa* produce una matriz impresionante de factores de virulencia, jugando todos un papel en su patogenicidad, una estrategia preferida para inhibir de manera eficiente la virulencia de *P. aeruginosa* es tomar como diana varios factores de virulencia.

III. RESUMEN DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de fusión que tiene especificidad de unión para pioverdina tipo I, II y III y pioquelina, que comprende

- 5 (a) un primer polipéptido que comprende o consiste en una muteína de lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos humana (hNGAL) que se une a pioverdina tipo I;
- (b) un segundo polipéptido que comprende o consiste en una muteína de hNGAL que se une a pioverdina tipo II;
- (c) un tercer polipéptido que comprende o consiste en una muteína de hNGAL que se une
10 a pioverdina tipo III; y
- (d) un cuarto polipéptido que comprende o consiste en una muteína de hNGAL que se une a pioquelina;
- en el que el primer, segundo, tercer y cuarto polipéptidos están unidos covalentemente.

- 15 En una realización, la muteína de hNGAL comprende un residuo de aminoácido mutado en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 28, 34, 36, 39-42, 44-47, 49, 52, 54-55, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134, 141 y 145 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (SEQ ID NO: 1).

- 20 En una realización la muteína de hNGAL se une a pioverdina tipo I, pioverdina tipo II, pioverdina tipo III y pioquelina, respectivamente, con una constante de disociación K_D de 200 nM o menor.

- En una realización, el primer, segundo, tercer y cuarto polipéptidos están unidos
25 covalentemente mediante moléculas conectoras.

En una realización, las moléculas conectoras son conectores peptídicos.

- En una realización, la molécula de fusión comprende además un dominio de multimerización
30 que permite la multimerización de la molécula de fusión.

En una realización, el dominio de multimerización es un dominio de dimerización que permite la dimerización de la molécula de fusión.

- 35 En una realización, el dominio de dimerización se selecciona del grupo que consiste en un dominio Fc, un dominio 2 de cadena pesada de IgE (EHD2), un dominio 2 de cadena pesada de IgM (MHD2), un dominio 3 de cadena pesada de IgG (GHD3), un dominio 3 de cadena pesada de IgA (AHD2), un dominio 3 de cadena pesada de IgD (DHD3), un dominio 4 de

cadena pesada de IgE (EHD4), un dominio 4 de cadena pesada de IgM (MHD4), un dominio de dimerización de uteroglobina y variantes o fragmentos de uno cualquiera de los anteriores.

En una realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4 humana.

5

En una realización, la proteína de fusión tiene una fórmula general seleccionada del grupo que consiste en

$$\begin{aligned} N' - X_1 - L_1 - X_2 - L_2 - X_3 - L_3 - X_4 - C' & \quad (I), \\ N' - X_1 - L_1 - X_2 - L_2 - X_3 - L_3 - X_4 - L_4 - MD - C' & \quad (II), \\ N' - MD - L_1 - X_1 - L_2 - X_2 - L_3 - X_3 - L_4 - X_4 - C' & \quad (III), \\ N' - X_1 - L_1 - X_2 - L_2 - MD - L_3 - X_3 - L_4 - X_4 - C' & \quad (IV), \\ N' - X_1 - L_1 - MD - L_2 - X_2 - L_3 - X_3 - L_4 - X_4 - C' & \quad (V), \text{ y} \\ N' - X_1 - L_1 - X_2 - L_2 - X_3 - L_3 - MD - L_4 - X_4 - C' & \quad (VI) \end{aligned}$$

10

en la que

15 X_1 , X_2 , X_3 y X_4 se seleccionan, en cada caso, del grupo que consiste en el primer, segundo, tercer y cuarto polipéptidos, con la condición de que la molécula de fusión comprende cada uno del primer, segundo, tercer y cuarto polipéptidos;

MD comprende un dominio de multimerización; y

20 L_1 , L_2 , L_3 y L_4 se seleccionan, en cada caso, independientemente de un enlace covalente y una molécula conectora.

En una realización, la molécula de fusión está presente como un complejo multimérico (por ejemplo, dimérico).

25 En una realización, la molécula de fusión comprende además al menos un marcaje o etiqueta que permite la detección y/o aislamiento de la molécula de fusión.

30 En una realización, la molécula de fusión comprende además una o más modificaciones que incrementan la estabilidad de la molécula de fusión y/o prolongan la vida media en suero de la molécula de fusión.

En una realización, la molécula de fusión inhibe o reduce la captación de hierro por *P. aeruginosa* a través de pioquelina y/o pioverdina.

35 En una realización, la molécula de fusión inhibe o reduce la expresión de factores de virulencia por *P. aeruginosa*.

En una realización, la molécula de fusión inhibe o reduce la señalización mediada por pioquelina y/o pioverdina.

5 En una realización, la molécula de fusión inhibe o reduce el crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa*.

En una realización, la molécula de fusión está asociada con o conjugada/fusionada con un agente farmacéuticamente activo.

10 En una realización, el agente farmacéuticamente activo se selecciona del grupo que consiste en un antibiótico, un agente citostático, una toxina, un metal o compuesto/complejo metálico, un agente quelante, un hapteno y un anticuerpo.

15 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la molécula de fusión como se ha definido anteriormente.

En una realización, la molécula de ácido nucleico está unida de forma operativa a una secuencia reguladora para permitir la expresión de la molécula de ácido nucleico.

20 En una realización, la molécula de ácido nucleico está comprendida en un vector.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped que contiene una molécula de ácido nucleico como se ha definido anteriormente.

25 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para producir la molécula de fusión como se ha definido anteriormente, en el que la molécula de fusión se produce (i) cultivando una célula huésped como se ha definido anteriormente en condiciones que permitan la expresión de la molécula de fusión y aislando la molécula de fusión de la célula huésped o su medio de cultivo, o (ii) traduciendo *in vitro* una molécula de ácido nucleico como se ha
30 definido anteriormente.

En un aspecto más, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una molécula de fusión como se ha definido anteriormente, una molécula de ácido
35 nucleico como se ha definido anteriormente, o una célula como se ha definido anteriormente.

En una realización, la composición farmacéutica comprende además un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición farmacéutica comprende además un agente farmacéuticamente activo adicional.

- 5 En una realización, el agente farmacéuticamente activo adicional se selecciona del grupo que consiste en un antibiótico, un agente citostático, una toxina, un metal o compuesto/complejo metálico, un agente quelante, un hapteno y un anticuerpo.

10 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un kit que comprende una molécula de fusión como se ha definido anteriormente, una molécula de ácido nucleico como se ha definido anteriormente, una célula como se ha definido anteriormente, o una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente.

15 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una molécula de fusión como se ha definido anteriormente, una molécula de ácido nucleico como se ha definido anteriormente, una célula como se ha definido anteriormente, o una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente para uso como un medicamento.

20 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una molécula de fusión como se ha definido anteriormente, una molécula de ácido nucleico como se ha definido anteriormente, una célula como se ha definido anteriormente, o una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente para uso en la prevención o tratamiento de una infección por biopelícula de *P. aeruginosa* en un sujeto.

25 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una molécula de fusión como se ha definido anteriormente, una molécula de ácido nucleico como se ha definido anteriormente, una célula como se ha definido anteriormente, o una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente para uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con o causado por infección por biopelícula de *P. aeruginosa* en un sujeto.

30 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para prevenir o tratar una infección por biopelícula de *P. aeruginosa* en un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva de una molécula de fusión como se ha definido anteriormente, una molécula de ácido nucleico como se ha definido anteriormente, una célula como se ha definido anteriormente, o una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente al sujeto.

35 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno asociado con o causado por una infección por biopelícula de *P.*

aeruginosa en un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva de una molécula de fusión como se ha definido anteriormente, una molécula de ácido nucleico como se ha definido anteriormente, una célula como se ha definido anteriormente, o una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente al sujeto.

5

En una realización, la infección por biopelícula de *P. aeruginosa* es infección aguda o crónica.

IV. DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 Figura 1: muestra la estructura de los sideróforos de *P. aeruginosa*. Las Fig. 1A-C muestran las estructuras de las tres pioverdinas de *P. aeruginosa*. Fig.1A: Estructura de Pvd tipo I (véase Birskot et al., 1989); Fig.1B: Estructura de Pvd tipo II (véase Birskot et al., 1989); Fig.1C: Estructura de Pvd tipo III (Gipp et al., 1991); Fig.1D: R unido a la parte de cromóforo puede ser una cadena lateral succinilo, succinamida o α -cetoglutarilo; y Fig.1E: Estructura de pioquelina
15 (Brandel et al., 2011).

Figura 2: proporciona medidas típicas de velocidad de asociación y velocidad de disociación por resonancia de plasmón superficial para la unión de Pvd I s (+Fe) a la muteína de lipocalina SEQ ID NO: 16 (A), unión de Pvd II s (+Fe) a la muteína de lipocalina SEQ ID NO: 36 (B), unión
20 de Pvd III (+Fe) a la muteína de lipocalina SEQ ID NO: 53 (C) y unión de pioquelina (+Fe) a SEQ ID NO: 62 (D). Además, la ausencia de unión de los sideróforos respectivos a 1.200 nM (200 nM para pioquelina) al control negativo SEQ ID NO: 64 se muestra en la Fig.1E-H.

Figura 3: muestra un perfil ejemplar de especificidad y reactividad cruzada para la muteína de lipocalina SEQ ID NO: 35 según se determina por resonancia de plasmón superficial. Se
25 demuestra la unión específica a pioverdina II succinilo, succinamida y α -cetoglutarilo, mientras se muestra la ausencia de unión a pioverdinas de tipo I y tipo III, pioquelina, enterobactina y desferoxamina. Se usan altas concentraciones de 2 μ M para todos los analitos.

Figura 4: muestra datos ejemplares del ensayo de inhibición del crecimiento. Fig. 4A: la muteína específica de Pvd I SEQ ID NO: 16 muestra inhibición del crecimiento de una cepa de *P. aeruginosa* específica de Pvd I (ATCC27853) comparado con el cultivo control creciendo sin
30 muteína. Fig. 4B: las muteínas específicas de Pvd II SEQ ID NOs: 19 y 36 muestran inhibición del crecimiento de una cepa de *P. aeruginosa* específica de Pvd II (ATCC15692) comparado con el cultivo control creciendo sin muteína. SEQ ID NO: 36 tiene una mayor afinidad de unión comparado con SEQ ID NO: 19 y muestra una mayor inhibición del crecimiento. Fig. 4C: la muteína específica de Pvd III SEQ ID NO: 53 muestra inhibición del crecimiento de una cepa de *P. aeruginosa* específica de Pvd III (ATCC33360) comparado con el cultivo control
35

creciendo sin muteína. Fig. 4D: las muteínas específicas de Pch SEQ ID NO: 62 muestra inhibición del crecimiento de una cepa de *P. aeruginosa* con Pvd I inactivada (ATCC15692 Δ pvdA) que se basa en Pch para la captación de hierro comparado con el cultivo control creciendo sin muteína. Se aplicaron 10 μ M de muteínas de lipocalina en el ensayo.

5

Figura 5: muestra en un modelo de infección de pulmón inducida por *P. aeruginosa* en ratones que la administración de SEQ ID NO: 19, 1 hora antes y en el momento del pulso bacteriano, previene el desarrollo de infección en los ratones de una manera dependiente de la dosis. Se observó un efecto de prevención significativo empezando a partir de SEQ ID NO: 19 a 200 μ g/ratón, con un efecto máximo a 2.000 μ g/ratón.

10

Figura 6: muestra la secuencia de aminoácidos expresada para cristalización (SEQ ID NO: 129), incluyendo una metionina de inicio en la posición 1, una lisina en la posición 2, una etiqueta hexahistidina en la posición 3 – 8, una región conectora de aminoácidos DYDIPTT en la posición 9 – 15 (SEQ ID NO: 132), el sitio de escisión de proteasa ENLYFQG del virus de grabado del tabaco (TEV) en la posición 16 – 22 (SEQ ID NO: 133) seguido de la secuencia de aminoácidos de la muteína de interés desde la posición 23 en adelante.

15

Figura 7: muestra la estructura del complejo SEQ ID NO: 31 – Pvd-Fe. Se muestra una superposición de dos moléculas SEQ ID NO: 31, es decir, cadena A y cadena B de una unidad asimétrica.

20

Figura 8: muestra las interacciones de SEQ ID NO: 31 y Pvd-Fe. Se superponen dos moléculas de unidad asimétrica. Se representan las cadenas laterales que interaccionan con Pvd-Fe.

25

Figura 9: muestra la composición de Pvd. Los átomos de oxígeno implicados en la unión de hierro están incluidos en cajas.

Figura 10A: muestra la estructura de una molécula de fusión según la presente invención. Las muteínas de lipocalina uno, dos, tres y cuatro (LM 1, 2, 3, 4) se fusionaron genéticamente mediante moléculas conectoras (aquí: conectores peptídicos de la secuencia (G₄S)₂; véase SEQ ID NO: 141), en el que LM 1 (SEQ ID NO: 34 ó 36) se unió a los sideróforos del grupo pioverdina II con ión hierro unido y sin ión hierro formando complejo, LM 2 (SEQ ID NO: 16 ó 17) se unió a los sideróforos del grupo pioverdina I con ión hierro unido y sin ión hierro formando complejo, LM 3 (SEQ ID NO: 50 ó 53) se unió a los sideróforos del grupo pioverdina III con ión hierro unido y sin ión hierro formando complejo y LM 4 (SEQ ID NO: 62 ó 63) se unió al sideróforo pioquelina con ión hierro unido y sin ión hierro formando complejo. La construcción de molécula de fusión (SEQ ID NO: 134 ó 135) comprendió capacidad de unión

30

35

para todos los sideróforos de *P. aeruginosa* en una molécula y tenía un resto de unión para cada grupo de Pvd y uno para pioquelina.

Figura 10B: muestra la estructura de una construcción de molécula de fusión con Fc según la presente invención. Las muteínas de lipocalina uno, dos, tres y cuatro (LM 1, 2, 3, 4) se fusionaron genéticamente mediante moléculas conectoras (aquí: conectores peptídicos de la secuencia (G₄S)₂; véase SEQ ID NO: 141) al extremo N del dominio Fc de IgG4 humana (hu IgG4-Fc; SEQ ID NO: 140), en el que LM 1 (SEQ ID NO: 34 ó 36) se unió a los sideróforos del grupo pioverdina II con ión hierro unido y sin ión hierro formando complejo, LM 2 (SEQ ID NO: 16 ó 17) se unió a los sideróforos del grupo pioverdina I con ión hierro unido y sin ión hierro formando complejo, LM 3 (SEQ ID NO: 50 ó 53) se unió a los sideróforos del grupo pioverdina III con ión hierro unido y sin ión hierro formando complejo y LM 4 (SEQ ID NO: 62 ó 63) se unió al sideróforo pioquelina con ión hierro unido y sin ión hierro formando complejo. La construcción de molécula de fusión con Fc (SEQ ID NO: 136 ó 137) comprendió capacidad de unión para todos los sideróforos de *P. aeruginosa* en una molécula y tenía dos restos de unión para cada grupo de Pvd y para pioquelina.

Figura 10C: muestra la estructura de una construcción de molécula de fusión con Fc según la presente invención. Las muteínas de lipocalina uno, dos, tres y cuatro (LM 1, 2, 3, 4) se fusionaron genéticamente mediante moléculas conectoras (aquí: conectores peptídicos de la secuencia (G₄S)₂; véase SEQ ID NO: 141) al extremo C del dominio Fc de IgG4 humana (hu IgG4-Fc; SEQ ID NO: 140), en el que LM 1 (SEQ ID NO: 34) se unió a los sideróforos del grupo pioverdina II con ión hierro unido y sin ión hierro formando complejo, LM 2 (SEQ ID NO: 17) se unió a los sideróforos del grupo pioverdina I con ión hierro unido y sin ión hierro formando complejo, LM 3 (SEQ ID NO: 50) se unió a los sideróforos del grupo pioverdina III con ión hierro unido y sin ión hierro formando complejo y LM 4 (SEQ ID NO: 63) se unió al sideróforo pioquelina con ión hierro unido y sin ión hierro formando complejo. La construcción de molécula de fusión con Fc (SEQ ID NO: 138) comprendió capacidad de unión para todos los sideróforos de *P. aeruginosa* en una molécula y tenía dos restos de unión para cada grupo de Pvd y para pioquelina.

Figura 10D: muestra la estructura de una construcción de molécula de fusión con Fc según la presente invención. Las muteínas de lipocalina uno y dos y tres y cuatro (LM 1, 2, 3, 4) se fusionaron genéticamente mediante moléculas conectoras (aquí: conectores peptídicos de la secuencia (G₄S)₂; véase SEQ ID NO: 141). LM 1 y LM 2 se fusionaron genéticamente al extremo N del dominio Fc de IgG4 humana (hu IgG4-Fc; SEQ ID NO: 140), y LM 3 y LM 4 se fusionaron genéticamente al extremo C del dominio Fc de IgG4 humana (hu IgG4-Fc; SEQ ID NO: 140), en el que LM 1 (SEQ ID NO: 34) se unió a los sideróforos del grupo pioverdina II con

ión hierro unido y sin ión hierro formando complejo, LM 2 (SEQ ID NO: 17) se unió a los sideróforos del grupo pioverdina I con ión hierro unido y sin ión hierro formando complejo, LM 3 (SEQ ID NO: 50) se unió a los sideróforos del grupo pioverdina III con ión hierro unido y sin ión hierro formando complejo y LM 4 (SEQ ID NO: 63) se unió al sideróforo pioquelina con ión hierro unido y sin ión hierro formando complejo. La construcción de molécula de fusión con Fc (SEQ ID NO: 139) comprendió capacidad de unión para todos los sideróforos de *P. aeruginosa* en una molécula y tenía dos restos de unión para cada grupo de Pvd y para pioquelina.

Figura 11: muestra un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de una molécula de fusión purificada (aquí: SEQ ID NO: 134).

Figura 12: muestra la unión de diferentes construcciones de molécula de fusión con Fc de SEQ ID NOs: 137, 138 y 139 y de las muteínas de lipocalinas simples respectivas de SEQ ID NOs: 17, 34, 50 y 63 a las variantes succinilo cargadas con hierro de los diferentes grupos de pioverdina y a pioquelina cargada con hierro en disolución, según se determina en un ensayo basado en ELISA. Todos los formatos de molécula de fusión con Fc fueron activos en la unión a las dianas simples y tuvieron valores CI_{50} comparables a los de las muteínas de lipocalina simples.

Figura 13: muestra que las moléculas de fusión (aquí: SEQ ID NO: 134) son capaces de unir simultáneamente pioverdina y pioquelina. La pioverdina biotinilada de cada uno de los grupos respectivos (I, II y III) con un residuo succinilo se capturó en placas MSD recubiertas con neutravidina, y se dejó que la molécula de fusión se uniera. La molécula de fusión unida se detectó mediante pioquelina marcada con etiqueta Sulfo.

Figura 14: muestra que las moléculas de fusión (aquí: SEQ ID NO: 134) son capaces de inhibir el crecimiento de una cepa que produce Pvd I (A), Pvd II (B) o Pvd III (C), o una cepa con PvdII inactivada $\Delta pvdA$ (D) en medio con hierro limitado.

Figura 15: muestra que las moléculas de fusión (aquí: SEQ ID NO: 134, referido como RA10680550) reducen significativamente la carga pulmonar de *P. aeruginosa* (CFU/gramo de tejido pulmonar) en un modelo de infección crónica después de una única dosis en el día 3 y que no ocurre recaída hasta el día 15. Muestra además que las moléculas de fusión no antagonizan la actividad de Tobramicina, y que, en una terapia de combinación, se produce la sinergia de las dos actividades. La media geométrica de la carga de cada tratamiento se indica por la barra horizontal. Por encima de cada columna, se registra la reducción Log_{10} (LogR) de ese grupo de tratamiento comparado con el vehículo (LOD = límite de detección).

Figura 16: muestra que las moléculas de fusión (aquí: SEQ ID NO: 134, también referido como RA10680550) bloquean el incremento del recuento de células blancas totales en el pulmón de ratas infectadas y de esta manera incrementa el aclaramiento de la infección. La combinación Tobramicina / molécula de fusión muestra un beneficio claro frente a cada uno de los
5 tratamientos simples. Recuentos absolutos de células de la sangre blancas en BAL (monocitos y neutrófilos) media + SD (células por ml de BAL) en los días 3, 5, 7, 9 y 15 después de la infección (escala Log).

Figura 17: muestra que las moléculas de fusión disminuyen la expresión de los factores de
10 virulencia durante la fase temprana de colonización (A) o la colonización establecida (B). La molécula de fusión ensayada de SEQ ID NO: 134 muestra un efecto significativo en la expresión de los genes de virulencia de *rhII* de *P. aeruginosa*. *rhII* está implicado en percepción de quorum produciendo N-butanoil homoserina lactona (BHL). BHL se une a su receptor RhIR, induciendo de esta manera la expresión de un complemento de genes, incluyendo su propio
15 loci (completando los circuitos de autoinducción).

Figura 18: muestra que la capacidad de unión de las moléculas de fusión no se ve influida por la longitud de la molécula conectora que separa las cuatro muteínas de lipocalina. Las moléculas conectoras ensayadas fueron glicina, GSGGSG (SEQ ID NO: 142) y (G4S)₂ (SEQ ID
20 NO: 141).

Figura 19: muestra que las moléculas de fusión con Fc previenen la producción de pioverdina por bacterias que crecen exponencialmente en un medio desprovisto de hierro. Las medias y s.e.m. de los valores cfu/ml y unidades arbitrarias de fluorescencia después de tratamiento con
25 una molécula de fusión con Fc (SEQ ID NO: 136) o una molécula de fusión con Fc control se muestran para la cepa de *P. aeruginosa* ATCC27853 (A y B), cepa ATCC15692 (C y D) y cepa ATCC33360 (E y F).

Figura 20: muestra que las moléculas de fusión con Fc previenen la producción de pioverdina
30 por bacterias que crecen exponencialmente en un medio desprovisto de hierro (véase también la Figura 20). Las cantidades relativas normalizadas de fluorescencia de pioverdina después de tratamiento con una molécula de fusión con Fc (SEQ ID NO: 136) o una molécula de fusión con Fc control se muestran para las cepas ATCC27853 (A), ATCC15692 (B) y ATCC33360 (C).

Figura 21: muestra que los efectos mostrados en las Figuras 19 y 20 son específicos de
35 pioverdina. Los valores medios de fluorescencia en cultivos de la cepa ATCC27853 y en una cepa doble mutante *pvdA/pchD* de ATCC27853 muestran que la cepa mutante incapaz de sintetizar estos sideróforos no presenta ninguna señal de fluorescencia.

Figura 22: muestra que los efectos mostrados en las Figuras 19 y 20 son específicos de pioverdina (véase también la Figura 21). Para normalizar la señal de fluorescencia, se usó pioverdina II purificada obtenida del sobrenadante de ATCC27853 de tipo salvaje para
5 adicionar a los cultivos antes de la adquisición de la señal de fluorescencia, y se obtuvo una curva de calibración.

Figura 23: muestra que la caída en la señal de fluorescencia en presencia de una molécula de fusión con Fc no se debió a apantallamiento de la fluorescencia después de la unión de
10 pioverdina por el compuesto. La molécula de fusión con Fc (SEQ ID NO: 136) se añadió extemporáneamente a un sobrenadante de cultivo que contenía pioverdina (obtenido con un cultivo filtrado de 24 horas de ATCC27853), y la fluorescencia se leyó inmediatamente y después de 24h. Como se muestra por los valores medios de fluorescencia observados en este experimento, no fue detectable apantallamiento de la fluorescencia.

Figura 24: muestra que las moléculas de fusión con Fc influyen en la cinética del crecimiento bacteriano. El impacto del tratamiento con 1 mg/mL con una molécula de fusión con Fc (SEQ
15 ID NO: 136) en las cepas ATCC15692 y ATCC33360 se muestra como medias y s.e.m. de cfu/mL en (A) y (B), respectivamente.

Figura 25: muestra el impacto de la concentración de hierro en la actividad transcripcional de *Ppchd*. Las medias y s.e.m. de la luminiscencia observada muestran que se indujo la expresión
20 del promotor *pchD* en el medio C-MS sin la adición de hierro y se reprimió por la adición de hierro, validando de esta manera la funcionalidad de la fusión con informador.

Figura 26: muestra el impacto del tratamiento con una molécula de fusión con Fc (SEQ ID NO: 136) en la actividad transcripcional de *Ppchd* en presencia de varias cantidades de hierro
25 suplementario. Las medias y s.e.m. de la luminiscencia observada muestran que la actividad promotora se suprimió en presencia de la molécula de fusión con Fc independientemente de la cantidad de hierro suplementada, mientras la molécula de fusión con Fc control no tuvo efecto.

Figura 27: muestra el impacto de un rango de dosis de una molécula de fusión con Fc (SEQ ID NO: 136) en la actividad transcripcional de *PpchD* ensayada sin suplemento de hierro. Los
30 puntos de medias y s.e.m. de la luminiscencia observada se ajustaron a una curva de respuesta a la dosis estándar y rindieron un valor CI_{50} de 0,03 mg/mL (95% CI: 0,02 - 0,05) para la molécula de fusión con Fc, mientras fue indefinido para la molécula de fusión con Fc de control isotópico.

V. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Aunque la presente invención se describe con más detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no está limitada a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente memoria ya que éstos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria es sólo para el propósito de describir realizaciones particulares, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención que sólo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas. A no ser que se define otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica.

En lo que sigue, se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se listan con realizaciones específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. No debe considerarse que los varios ejemplos y realizaciones preferidas descritas limitan la presente invención sólo a las realizaciones descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción apoya y engloba realizaciones que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de los elementos descritos y/o preferidos. Además, debe considerarse que cualesquiera permutaciones y combinaciones de todos los elementos descritos en esta solicitud están descritas por la descripción de la presente solicitud a no ser que el contexto indique otra cosa.

Preferiblemente, los términos usados en la presente memoria se definen como se describen en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, y H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza, (1995).

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, métodos convencionales de química, bioquímica, biología celular, inmunología, y técnicas de ADN recombinante que se explican en la bibliografía en el campo (Sambrook, J. et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

A lo largo de esta especificación y las reivindicaciones que siguen, a no ser que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas indicado pero no la exclusión de cualquier otro miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas aunque en

algunas realizaciones dicho otro miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas pueden excluirse, es decir, el contenido consiste en la inclusión de un miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas indicado. Los términos “un” y “una” y “el” y referencia similar usada en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben considerarse que engloban tanto el singular como el plural, a no ser que se indique otra cosa en la presente memoria o se contradiga claramente por el contexto. La recitación de intervalos de valores en la presente memoria se pretende que sirva meramente como un método de abreviatura para hacer referencia individualmente a cada valor separado que se encuentra en el intervalo. A no ser que se indique otra cosa en la presente memoria, cada valor individual está incorporado en la especificación como si se recitaran individualmente en la presente memoria. Todos los métodos descritos en la presente memoria pueden realizarse en cualquier orden adecuado a no ser que se indique otra cosa en la presente memoria o se contradiga claramente de otra forma por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, “tal como”), proporcionado en la presente memoria se pretende meramente para ilustrar mejor la invención y no supone una limitación en el alcance de la invención reivindicada de otra manera. No debe considerarse que el lenguaje en esta especificación indica que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

A lo largo del texto de esta especificación se citan varios documentos. Cada uno de los documentos citados en la presente memoria (incluyendo todas las patentes, solicitudes de patente, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, etc.), ya estén *supra* o *infra*, se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad. En la presente memoria, nada debe considerarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a anteceder dicha descripción gracias a la invención anterior.

A. Moléculas de fusión

La presente invención proporciona moléculas de fusión que tienen especificidad da unión para pioverdina tipo I, II y III y pioquelina, que comprenden

- (a) un primer polipéptido que comprende o consiste en una muteína de lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos humana (hNGAL) que se une a pioverdina tipo I;
- (b) un segundo polipéptido que comprende o consiste en una muteína de hNGAL que se une a pioverdina tipo II;
- (c) un tercer polipéptido que comprende o consiste en una muteína de hNGAL que se une a pioverdina tipo III; y
- (d) un cuarto polipéptido que comprende o consiste en una muteína de hNGAL que se une a pioquelina;

en el que el primer, segundo, tercer y cuarto polipéptidos están unidos covalentemente.

El término “molécula de fusión” se refiere generalmente a moléculas creadas uniendo dos o más moléculas distintas (por ejemplo, (poli-)péptidos o proteínas), particularmente cabeza-a-cola (por ejemplo, N-terminal a C-terminal o vice versa), lo que resulta en una única molécula con propiedades funcionales derivadas de cada una de las moléculas originales (por ejemplo, (poli-)péptidos o proteínas). En una realización, la molécula de fusión es una proteína de fusión.

El término “especificidad de unión”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad de un ligando (por ejemplo, la molécula de fusión de la invención) para discriminar entre la o las dianas (por ejemplo, pioverdina tipo I, II y III y pioquelina) y una o más dianas de referencia, ya que la especificidad de unión no es una propiedad absoluta sino relativa. La unión específica puede determinarse, por ejemplo, según transferencias Western, ensayos ELISA, RIA, ECL, IRMA, FACS, IHC y escaneos peptídicos.

Tal y como se usa en la presente memoria, “pioverdina” significa un sideróforo fluorescente que se produce por la bacteria gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* en condiciones de crecimiento deficientes en hierro y tiene una alta afinidad para el hierro. Las pioverdinas están compuestas por tres partes estructurales: un cromóforo dihidroquinolina, una cadena lateral y una cadena peptídica variable. El resto de cadena peptídica está implicado en el reconocimiento y unión a receptor. Se han identificado tres Pvd diferentes, que se diferencian en su cadena peptídica (tipos I-III; Figura 1A-D). El tamaño y composición de aminoácidos de los tipos de pioverdina son únicos para cada especie, así como la especificidad de reconocimiento de la pioverdina. Pueden distinguirse tres cepas de *P. aeruginosa*, produciendo cada una un tipo diferente de pioverdina y un receptor FpvA cognado. Cada tipo tiene tres miembros (subtipos) que se diferencian en la cadena lateral que es succinilo, succinamida o α -cetoglutarilo, concretamente, Pvd tipo I succinilo, Pvd tipo I succinamida, Pvd tipo I α -cetoglutarilo, Pvd tipo II succinilo, Pvd tipo II succinamida, Pvd tipo II α -cetoglutarilo, Pvd tipo III succinilo, Pvd tipo III succinamida y Pvd tipo III α -cetoglutarilo.

Tal y como se usa en la presente memoria, “pioquelina” significa un conjugado derivatizado de tiazolina de salicilato y dos moléculas de cisteína que tienen funcionalidades de ligando fenol, carboxilato, y amina, producidas por *P. aeruginosa* y que solubilizan ión férrico. La pioquelina es un sideróforo estructuralmente único que posee fenolato, pero no un resto hidroxamato ni catecolato (Figura 1E).

El término “lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (hNGAL)” (también referido como

“lipocalina 2 humana” o “Lcn 2 humana” o “NGAL humana” o simplemente “lipocalina”), tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos humanos madura (NGAL) con el número de acceso del banco de datos SWISS-PROT/UniProt P80188. Una muteína de NGAL humana (hNGAL) también puede designarse en la presente memoria como “muteína de lipocalina” o simplemente “muteína”. La secuencia de aminoácidos mostrada en el número de acceso del banco de datos SWISS-PROT/UniProt P80188 puede usarse como una “secuencia de referencia” particular. En una realización, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 se usa como una secuencia de referencia. hNGAL de tipo salvaje no se une a pioverdinas o pioquelina. El ligando natural de hNGAL de tipo salvaje es enterobactina, que se acopla en el cáliz de hNGAL con alta afinidad.

Tal y como se usa en la presente memoria, una “muteína,” una entidad “mutada” (ya sea proteína o ácido nucleico), o “mutante” se refiere al intercambio, delección, o inserción de uno o más nucleótidos o aminoácidos, comparado con la secuencia/soporte de ácido nucleico o proteína natural (tipo salvaje) de referencia. Dicho término también incluye fragmentos de una muteína y variantes como se describe en la presente memoria. Las muteínas para uso en las moléculas de fusión de la invención, fragmentos o variantes de éstas retienen preferiblemente la función de unión a pioverdina o pioquelina como se describe en la presente memoria.

En una realización, las muteínas de hNGAL comprendidas por el primer, segundo, tercer y cuarto polipéptidos son específicas para o se unen específicamente a pioverdina tipo I, II y III y pioquelina, respectivamente.

Cuando se usa en la presente memoria en el contexto de muteínas de hNGAL que se unen a pioverdina o pioquelina, el término “específico para” incluye que la muteína está dirigida frente a, se une a, o reacciona con pioverdina o pioquelina, respectivamente. Así, estar dirigida a, unirse a o reaccionar con incluye que la muteína se une específicamente a pioverdina o pioquelina, respectivamente. El término “específicamente” en este contexto significa que la muteína reacciona con una proteína pioverdina o una proteína pioquelina, como se describe en la presente memoria, pero esencialmente no con otra proteína. El término “otra proteína” incluye cualquier proteína no pioverdina o no pioquelina, respectivamente, incluyendo proteínas relacionadas de cerca con o que son homólogas a pioverdina o pioquelina frente a las que están dirigidas las muteínas descritas en la presente memoria. Sin embargo, las proteínas pioverdina o pioquelina, fragmentos y/o variantes de especies distintas del ser humano tales como las descritas en el contexto de la definición “sujeto” no se excluyen por el termino “otra proteína”. El término “no se une esencialmente” significa que la muteína de la presente descripción no se une a otra proteína, es decir, muestra una reactividad cruzada de menos del 30%, particularmente 20%, más particularmente 10%, incluso más particularmente menos del

9, 8, 7, 6 ó 5%. Si la muteína reacciona específicamente como se ha definido anteriormente en la presente memoria puede ensayarse fácilmente, entre otros, comparando la reacción de una muteína de lipocalina de la presente descripción con pioverdina o pioquelina y la reacción de dicha muteína con otra u otras proteínas. La “unión específica” también puede determinarse, por ejemplo, según transferencias Western, ensayos ELISA, RIA, ECL, IRMA, FACS, IHC y escaneos peptídicos.

En una realización, las muteínas de hNGAL comprendidas por el primer, segundo, tercer y cuarto polipéptidos se unen a pioverdina tipo I, II y III y pioquelina, respectivamente, con afinidad detectable.

Tal y como se usa en la presente memoria, “afinidad detectable” significa la capacidad de unirse a una diana seleccionada con una constante de disociación K_D de generalmente aproximadamente 10^{-5} M o menor, por ejemplo, aproximadamente 10^{-6} M o menor, o aproximadamente 10^{-7} M o menor. Las afinidades menores (es decir, valores mayores de K_D) generalmente no se pueden ya medir con métodos comunes tales como ELISA y por lo tanto tienen una importancia secundaria.

Tal y como se usa en la presente memoria, la “afinidad de unión” de una proteína de la descripción (por ejemplo, una muteína de lipocalina 2 humana) a una diana seleccionada (en el caso presente, pioverdina o pioquelina), puede medirse (y de esta manera determinarse los valores K_D de un complejo muteína-ligando) por una multitud de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero no están limitados a, titulación por fluorescencia, ELISA directo, ELISA de competición, métodos calorimétricos, tales como calorimetría de titulación isotérmica (ITC), y resonancia de plasmón superficial (Biacore). Dichos métodos están bien establecidos en la técnica y también se detallan a continuación ejemplos de éstos.

También debe indicarse que la formación de complejo entre el ligante respectivo y su ligando se ve influida por muchos factores diferentes tales como las concentraciones de las parejas de unión respectivas, la presencia de competidores, el pH y la fuerza iónica del sistema de tampón usado, y el método experimental usado para la determinación de la constante de disociación K_D (por ejemplo, titulación por fluorescencia, ELISA directo, ELISA de competición o resonancia de plasmón superficial, sólo por nombrar algunos) o incluso el algoritmo matemático que se usa para la evaluación de los datos experimentales.

Por lo tanto, también está claro para el experto en la técnica que los valores K_D (constante de disociación del complejo formado entre el ligante respectivo y su diana/ligando) pueden variar

en un determinado intervalo experimental, dependiendo del método y ajuste experimental que se usa para determinar la afinidad de una muteína particular para un ligando dado. Esto significa que puede haber una ligera desviación en los valores K_D medidos o un intervalo de tolerancia dependiendo, por ejemplo, de si el valor K_D se determinó por resonancia de plasmón superficial (Biacore), por ELISA de competición, o por “ELISA directo”.

En algunas realizaciones, la muteína específica para pioverdina (tipo I, II o III) como se usa en la molécula de fusión de la invención es capaz de unirse a pioverdina (tipo I, II o III, respectivamente) con una constante de disociación K_D de 200 nM o menor, o aproximadamente 100 nM o menor, o aproximadamente 50 nM o menor, o aproximadamente 25 nM o menor, o aproximadamente 15 nM o menor. En algunas realizaciones, la muteína específica para pioquelina como se usa en la molécula de fusión de la invención es capaz de unirse a pioquelina con una constante de disociación K_D de 200 nM o menor, o aproximadamente 100 nM o menor, o aproximadamente 50 nM o menor, o aproximadamente 25 nM o menor, o aproximadamente 15 nM o menor. En algunas realizaciones adicionales particulares, una muteína de la molécula de fusión según la presente invención se une a pioverdina (tipo I, II o III) o pioquelina, respectivamente, con una constante de disociación para pioverdina (tipo I, II o III, respectivamente) o pioquelina de aproximadamente 10 nM o menor, o aproximadamente 5 nM o menor, o aproximadamente 2 nM o menor, o aproximadamente 1 nM o menor, o aproximadamente 0,1 nM o menor, o aproximadamente 10 pM o menor.

En realizaciones particulares, la molécula de fusión de la invención se une a pioverdina (tipo I, II y III) y pioquelina con una constante de disociación K_D respectiva de 200 nM o menor, o aproximadamente 100 nM o menor, o aproximadamente 50 nM o menor, o aproximadamente 25 nM o menor, o aproximadamente 15 nM o menor, o aproximadamente 10 nM o menor, o aproximadamente 5 nM o menor, o aproximadamente 2 nM o menor, o aproximadamente 1 nM o menor, o aproximadamente 0,1 nM o menor, o aproximadamente 10 pM o menor.

En una realización, el valor K_D se determina por resonancia de plasmón superficial (Biacore), por ELISA de competición, o por “ELISA directo”.

Las muteínas de hNGAL para uso en las moléculas de fusión de la presente invención así como métodos para su generación e identificación se divulgan/describen con detalle en EP 15 305 242.8 y PCT/EP2016/053226 así como en la sección “muteínas de hNGAL” más adelante.

En una realización particular, una muteína de hNGAL que es específica para pioverdina tipo I se muestra en una cualquiera de SEQ ID NOs: 2-18 (por ejemplo, SEQ ID NO: 16). En una realización particular, una muteína de hNGAL que es específica para pioverdina tipo II se muestra en una cualquiera de SEQ ID NOs: 19-37 (por ejemplo, SEQ ID NO: 36). En una

realización particular, una muteína de hNGAL que es específica para pioverdina tipo III se muestra en una cualquiera de SEQ ID NOs: 38-53 (por ejemplo, SEQ ID NO: 53). En una realización particular, una muteína de hNGAL que es específica para pioquelina se muestra en una cualquiera de SEQ ID NOs: 54-63 (por ejemplo, SEQ ID NO: 62).

5

El término “unido covalentemente”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una unión mediante un enlace covalente o mediante una molécula conectora covalente. En una realización, el primer, segundo, tercer y cuarto polipéptidos están unidos covalentemente mediante moléculas conectoras.

10

El término “moléculas conectoras”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a moléculas adaptadas para conectar/unir restos proteicos, por ejemplo, el primer, segundo, tercer y cuarto polipéptidos como se define en la presente memoria. Una molécula conectora según la presente invención puede tener cualquier tamaño/longitud. Sin embargo, es preferiblemente lo suficientemente larga como para proporcionar un grado adecuado de flexibilidad para evitar que los restos conectados/unidos interfieran con la actividad de los otros, por ejemplo, por impedimento estérico, y para permitir el plegamiento correcto de la proteína; aún así es preferiblemente lo suficientemente corta como para proporcionar estabilidad (por ejemplo, estabilidad proteolítica) en la célula. Las moléculas conectoras adecuadas son conocidas para el experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, péptidos así como moléculas no peptídicas, por ejemplo, oligómeros y polímeros no peptídicos de longitudes adecuadas. Según la presente invención, las distintas moléculas conectoras en una única molécula de fusión descrita en la presente memoria pueden ser la misma o diferentes.

25

En una realización, las moléculas conectoras son conectores peptídicos. Un conector peptídico según la presente invención puede tener cualquier longitud, es decir, puede comprender cualquier número de residuos de aminoácidos. Sin embargo, es preferiblemente lo suficientemente larga como para proporcionar un grado adecuado de flexibilidad para evitar que los restos conectados/unidos interfieran con la actividad de los otros, por ejemplo, por impedimento estérico, y para permitir el plegamiento correcto de la proteína; aún así es preferiblemente lo suficientemente corta como para proporcionar estabilidad (por ejemplo, estabilidad proteolítica) en la célula. En algunas realizaciones, los conectores peptídicos tienen una longitud de 1 a 30 aminoácidos, o una longitud de 1 a 25 aminoácidos, o una longitud de 1 a 20 aminoácidos, o una longitud de 1 a 15 aminoácidos, o una longitud de 1 a 12 aminoácidos, o una longitud de 1 a 10 aminoácidos. Así, según la presente invención, un conector peptídico puede estar compuesto por un único residuo de aminoácido, por ejemplo, glicina (Gly, G).

30

35

Los aminoácidos de un conector peptídico según la presente invención pueden seleccionarse de todos los aminoácidos naturales o no naturales, en particular de los aminoácidos glicina (Gly, G), serina (Ser, S) y treonina (Thr, T). En una realización, el conector peptídico es un conector rico en glicina-serina-treonina o un conector rico en glicina-serina, en el que al menos 5 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90% de los aminoácidos son un residuo de glicina o serina o treonina o un residuo de glicina o serina, respectivamente. En otra realización, los aminoácidos se seleccionan de glicina, serina y treonina, es decir, el conector peptídico está compuesto exclusivamente por residuos de glicina, serina y treonina (referido como un conector glicina-serina-treonina). En otra realización más, el conector 10 peptídico está compuesto exclusivamente por residuos de glicina y serina (referido como un conector glicina-serina).

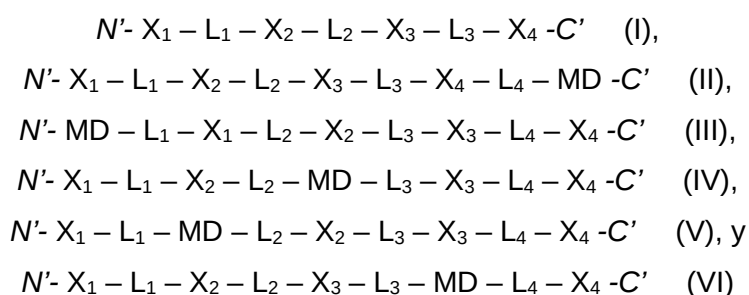
En una realización, el conector peptídico es un conector glicina-serina y tiene una longitud de 1 a 30 aminoácidos, o una longitud de 1 a 25 aminoácidos, o una longitud de 1 a 20 aminoácidos, 15 o una longitud de 1 a 15 aminoácidos, o una longitud de 1 a 12 aminoácidos, o una longitud de 1 a 10 aminoácidos. Los conectores peptídicos particulares según la presente invención tienen la fórmula general $(GGGGX)_n$, en la que X se selecciona, en cada caso, independientemente de S y T, y n es un número entero de 1 a 5, ó 1 a 4, ó 1 a 3, ó 1 y 2. En una realización, el conector peptídico tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 141. En otra realización, 20 el conector peptídico tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 142.

En una realización, la molécula de fusión comprende además un dominio de multimerización que permite la multimerización de la molécula de fusión. La multimerización puede ocurrir por interacción no covalente y/o interacción covalente, en particular mediante uno o más enlaces 25 disulfuro, entre múltiples (por ejemplo, 2, 3 ó 4, particularmente 2 ó 3, más particularmente 2) dominios de multimerización.

Los dominios de multimerización adecuados son conocidos para un experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, dominios de trimerización, tales como un resto tenascina de 30 trimerización, un dominio colectina de trimerización y estreptavidina, y dominios de dimerización, tales como un dominio Fc, un dominio 2 de cadena pesada de IgE (EHD2), un dominio 2 de cadena pesada de IgM (MHD2), un dominio 3 de cadena pesada de IgG (GHD3), un dominio 3 de cadena pesada de IgA (AHD2), un dominio 3 de cadena pesada de IgD (DHD3), un dominio 4 de cadena pesada de IgE (EHD4), un dominio 4 de cadena pesada de 35 IgM (MHD4), un dominio uteroglobina de dimerización. En una realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4 humano, que, en una realización particular, comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 140. También se incluyen variantes o fragmentos de uno cualquiera de los dominios anteriores, por ejemplo, dominios que se han modificado de

manera que se prolonga su vida media y/o se incrementa su eficiencia, siempre que todavía permitan la multimerización (por ejemplo, dimerización) de la molécula de fusión, es decir, son funcionales. Las modificaciones adecuadas son conocidas para un experto en la técnica e incluyen, pero no están limitadas a, modificaciones del dominio Fc que incrementan su afinidad para FcRn, como se describe, por ejemplo, en Zalevsky, J. et al. (2010), Nature Biotechnology, 28(2):157-9 (por ejemplo, N434S, V259I/V308F, M252Y/S254T/T256E, M428L/N434S, y V259I/V308F/M428L).

En una realización, la molécula de fusión tiene una fórmula general seleccionada del grupo que consiste en



en la que

X_1 , X_2 , X_3 y X_4 se seleccionan, en cada caso, del grupo que consiste en el primer, segundo, tercer y cuarto polipéptidos, con la condición de que la molécula de fusión comprende cada uno del primer, segundo, tercer y cuarto polipéptidos; MD comprende un dominio de multimerización; y L_1 , L_2 , L_3 y L_4 se seleccionan, en cada caso, independientemente de un enlace covalente y una molécula conectora.

Según la presente invención, L_1 , L_2 , L_3 y L_4 pueden ser el mismo o diferente.

En una realización, la molécula de fusión está presente como un complejo multimérico (por ejemplo, dimérico).

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención también proporciona un multímero (o complejo multimérico) que comprende dos o más moléculas de fusión descritas en la presente memoria (por ejemplo, un dímero o complejo dimérico). Dicho complejo también puede referirse como complejo de moléculas de fusión. En una realización, las dos o más moléculas de fusión se asocian no covalentemente o covalentemente (por ejemplo, mediante enlaces disulfuro) para formar el complejo de moléculas de fusión.

En una realización, la molécula de fusión comprende además al menos un marcaje o etiqueta que permite la detección y/o aislamiento de la molécula de fusión.

Un “marcaje o etiqueta que permite la detección y/o aislamiento de la molécula de fusión” se pretende que incluya cualesquiera marcajes/etiquetas conocidas en la técnica para estos propósitos. Incluyen etiquetas de afinidad tales como Strep-tag® o Strep-tag® II (Schmidt, T.G.M. et al. (1996) J. Mol. Biol. 255, 753-766), la etiqueta myc, la etiqueta FLAG, la etiqueta His6 o la etiqueta HA o proteínas tales como la proteína de unión a maltosa (MBP) y glutatión-S-transferasa (GST) así como combinaciones de éstas (por ejemplo, Strep-tag® o Strep-tag® II y etiqueta His-6). Las proteínas con propiedades cromogénicas o fluorescentes tales como la proteína verde fluorescente (GFP) o la proteína amarilla fluorescente (YFP) también son
10 marcajes adecuados.

La secuencia de aminoácidos de un marcaje o etiqueta de (poli)péptido puede introducirse en cualquier posición en la secuencia de aminoácidos de la molécula de fusión, y puede, por ejemplo, tomar la forma de un bucle en la estructura proteica codificada (por ejemplo, en
15 cualesquiera conectores peptídicos descritos en la presente memoria o incluso en las muteínas siempre que el marcaje/etiqueta no interfiera con su función), o puede fusionarse en el extremo N terminal o C terminal. El marcaje o etiqueta puede contener además un sitio de escisión que permite la eliminación del marcaje o etiqueta de la molécula de fusión. De forma similar, pueden conjugarse marcajes o etiquetas no peptídicos, por ejemplo, tintes fluorescentes, con la
20 molécula de fusión en cualquier sitio adecuado.

En general, es posible marcar las moléculas de fusión de la invención con cualquier sustancia química o enzima apropiada, que genera directamente o indirectamente un compuesto o señal detectable en una reacción química, física, óptica, o enzimática. Un ejemplo de una reacción
25 física y al mismo tiempo reacción/marcador óptico es la emisión de fluorescencia después de irradiación o emisión de rayos X cuando se usa un marcaje radiactivo. La fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano y β -galactosidasa son ejemplos de marcajes enzimáticos (y al mismo tiempo marcajes ópticos) que catalizan la formación de productos de reacción cromogénicos.

La molécula de fusión también puede comprender una secuencia de aminoácidos para facilitar la secreción de la molécula, tal como una señal de secreción N-terminal, o una secuencia señal. La molécula de fusión de la invención puede comprender además un dominio de unión que sirve, por ejemplo, para aumentar la selectividad para un tipo celular específico. Esto puede conseguirse, por ejemplo, proporcionando un dominio de unión que se une a un
35 antígeno específico expresado en la superficie de dicho tipo celular.

En una realización, la molécula de fusión comprende además una o más modificaciones que incrementan la estabilidad de la molécula de fusión y/o prolongan la vida media en suero de la molécula de fusión.

- 5 En una realización, “estabilidad” de la molécula de fusión se refiere a la “vida media” de la molécula de fusión, por ejemplo, *in vivo*. “Vida media” se refiere al periodo de tiempo que se necesita para eliminar la mitad de la actividad, cantidad, o número de moléculas.

La molécula de fusión puede conjugarse en algunas realizaciones con un resto que prolonga la vida media en suero de la molécula de fusión (a este respecto véase también la publicación PCT WO 2006/56464 A2 en la que se describen dichas estrategias de conjugación con referencias a muteínas de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos humano con afinidad de unión para CTLA-4). El resto que prolonga la vida media en suero puede ser una molécula de polialquilen glicol, hidroxietil almidón, ácido polisiálico, moléculas de ácidos grasos, tales como ácido palmítico (Vajo y Duckworth 2000, Pharmacol. Rev. 52, 1-9), una parte Fc de una inmunoglobulina, un dominio CH3 de una inmunoglobulina, un dominio CH4 de una inmunoglobulina, un péptido de unión a albúmina, una proteína de unión a albúmina, o transferrina por nombrar sólo algunos. La proteína de unión a albúmina puede ser una proteína de unión a albúmina bacteriana, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo incluyendo anticuerpos de dominio (véase la patente US 6.696.245, por ejemplo), o una muteína con actividad de unión para albúmina. De acuerdo con esto, las parejas de conjugación adecuadas para prolongar la vida media de una molécula de fusión de la invención incluyen una proteína de unión a albúmina, por ejemplo, un dominio de unión a albúmina bacteriano, tal como el de la proteína G streptococcal (König, T., y Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83). Otros ejemplos de péptidos de unión a albúmina que pueden usarse como pareja de conjugación son, por ejemplo, aquellos que tienen una secuencia consenso Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys, en la que Xaa₁ es Asp, Asn, Ser, Thr, o Trp; Xaa₂ es Asn, Gln, His, Ile, Leu, o Lys; Xaa₃ es Ala, Asp, Phe, Trp, o Tyr; y Xaa₄ es Asp, Gly, Leu, Phe, Ser, o Thr como se describe en la solicitud de patente US 2003/0069395 o Dennis et al. (Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. y Damico, L. A. (2002) J Biol Chem 277, 35035-35043).

En otras realizaciones, puede usarse la albúmina en sí misma (Osborn, B.L. et al., 2002, J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 540-548), o un fragmento biológico activo de albúmina como pareja de conjugación de una molécula de fusión de la invención. El término “albúmina” incluye todas las albúminas de mamífero tales como albúmina de suero humano o albúmina de suero bovino o albúmina de rata. La albúmina o fragmento de ésta puede producirse recombinantemente como se describe en la patente US 5.728.553 o las solicitudes de patente europea EP 0 330

451 y EP 0 361 991. La albúmina recombinante humana (Recombumin®) Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, Reino Unido) puede conjugarse o fusionarse con una molécula de fusión de la invención con el fin de prolongar la vida media de la molécula de fusión.

- 5 Si la proteína de unión a albúmina es un fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo de dominio. Los anticuerpos de dominio (dAbs) se preparan por ingeniería para permitir el control preciso sobre propiedades biológicas y vida media *in vivo* para crear el perfil de producto con seguridad y eficacia óptimas. Los anticuerpos de dominio están, por ejemplo, disponibles comercialmente en Domantis Ltd. (Cambridge, Reino Unido y MA, EEUU).

10 Usando transferrina como un resto para prolongar la vida media en suero de las moléculas de fusión de la invención, las moléculas de fusión pueden fusionarse genéticamente al extremo N o C, o ambos, de transferrina no glicosilada. La transferrina no glicosilada tiene una vida media de 14-17 días, y una proteína de fusión con transferrina tendrá de manera similar una vida media prolongada. El vehículo transferrina también proporciona una alta biodisponibilidad, biodistribución y estabilidad en circulación. Esta tecnología está disponible comercialmente en BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, EEUU). La transferrina recombinante humana (DeltaFerrin™) para uso como una pareja para estabilizar la proteína/prolongar la vida media también está disponible comercialmente en Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, Reino Unido).

Si se usa una parte Fc de una inmunoglobulina para el propósito de prolongar la vida media en suero de las muteínas de la invención, puede usarse la tecnología SynFusion™, disponible comercialmente en Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA, EEUU). El uso de esta tecnología de fusión a Fc permite la creación de biofarmacéuticos con actividad prolongada y puede consistir por ejemplo en dos copias de cada una de las al menos cuatro muteínas unidas a la región Fc de un anticuerpo para mejorar la farmacocinética, solubilidad, y eficiencia de producción.

30 Otra alternativa más para prolongar la vida media de las moléculas de fusión de la invención es fusionar al extremo N o C de las moléculas de fusión, secuencias ricas en glicina largas, desestructuradas, flexibles (por ejemplo, poli-glicina con aproximadamente 20 a 80 residuos de glicina consecutivos). Esta estrategia descrita en WO 2007/038619, por ejemplo, también se ha denominado "rPEG" (PEG recombinante).

35 Si se usa polialquilen glicol como una pareja de conjugación, el polialquilen glicol puede estar sustituido, no sustituido, ser lineal o ramificado. También puede ser un derivado de polialquilen activado. Los ejemplos de compuestos adecuados son moléculas de polietilen glicol (PEG) como se describe en WO 99/64016, en la Patente US 6.177.074 o en la Patente US 6.403.564

en relación con interferón, o como se describe para otras proteínas tales como asparaginasa modificada con PEG, PEG-adenosina desaminasa (PEG-ADA) o PEG-superóxido dismutasa (véase, por ejemplo, Fuertges et al. (1990) The Clinical Efficacy of Poly(Ethylene Glycol)-Modified Proteins J. Control. Release 11, 139-148). El peso molecular de dicho polímero, tal como polietilen glicol, puede variar de aproximadamente 300 a aproximadamente 70.000 Dalton, incluyendo, por ejemplo, polietilen glicol con un peso molecular de aproximadamente 10.000, de aproximadamente 20.000, de aproximadamente 30.000 o de aproximadamente 40.000 Dalton. Además, como se describe, por ejemplo, en las patentes US 6.500.930 ó 6.620.413, pueden conjugarse oligo y polímeros de carbohidratos tales como almidón o hidroxietil almidón (HES) con una molécula de fusión de la invención para el propósito de prolongar la vida media en suero.

En una realización, las moléculas de fusión de la invención se fusionan en su extremo N y/o su extremo C con una pareja de fusión que es un dominio proteico que prolonga la vida media en suero de las moléculas de fusión. En realizaciones particulares adicionales, el dominio proteico es una parte Fc de una inmunoglobulina, un dominio CH3 de una inmunoglobulina, un dominio CH4 de una inmunoglobulina, un péptido de unión a albúmina, o una proteína de unión a albúmina.

En otra realización, las moléculas de fusión de la invención se conjugan con un compuesto que prolonga la vida media en suero de las moléculas de fusión. Más particularmente, la muteína se conjuga con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en una molécula de polialquilen glicol, un hidroxietil almidón, una parte Fc de una inmunoglobulina, un dominio CH3 de una inmunoglobulina, un dominio CH4 de una inmunoglobulina, un péptido de unión a albúmina, y una proteína de unión a albúmina.

En una realización, la molécula de fusión inhibe o reduce la captación de hierro por *P. aeruginosa* a través de pioquelina y/o pioverdina.

En una realización, la molécula de fusión reduce la expresión de factores de virulencia por *P. aeruginosa*.

En una realización, la molécula de fusión inhibe o reduce el crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa*.

En una realización, la molécula de fusión está asociada con o se conjuga/fusiona con un agente farmacéuticamente activo. Dichos conjugados pueden producirse por métodos muy conocidos en la técnica.

En una realización, el agente farmacéuticamente activo se selecciona del grupo que consiste en un antibiótico, un agente citostático, una toxina, una enzima, un metal o compuesto/complejo metálico, un agente quelante, un radionúclido, una molécula orgánica
5 pequeña, un péptido terapéuticamente activo, una molécula de ácido nucleico terapéuticamente activa, un hapteno y un anticuerpo.

Los antibióticos adecuados incluyen Tobramicina, Azitromicina, Aztreonam, Colistina y carbapenemos.

Los metales o compuestos/complejos metálicos adecuados son galio, compuestos de galio y complejos basados en galio.

El término “molécula orgánica pequeña”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a
15 una molécula orgánica que comprende al menos dos átomos de carbono, pero preferiblemente no más de 7 ó 12 enlaces de carbono orientables, que tiene un peso molecular en el intervalo entre 100 y 2.000 Dalton, particularmente entre 100 y 1.000 Dalton, o < 900 Dalton, y opcionalmente que incluye uno o dos átomos de metal.

El término “péptido terapéuticamente activo” se refiere, por ejemplo, a péptidos que actúan como agonistas/antagonistas de un receptor de la superficie celular o péptidos que compiten para un sitio de unión de proteína en una diana celular dada.

El término “molécula de ácido nucleico terapéuticamente activa” se refiere, por ejemplo, a
25 moléculas de ácido nucleico antisentido, ARN de interferencia pequeños, micro ARN o ribozimas.

Los agentes farmacéuticamente activos particulares incluyen Dornasa alfa, corticosteroides, modificadores de leucotrieno, N-acetilcisteína, glutatión inhalado, anticolinérgicos, ibuprofeno y
30 agonistas del receptor β 2-adrenérgico.

En una realización, la molécula de fusión comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 134 a 139 y SEQ ID NOs: 143 a 186, en el que, en realizaciones particulares, las secuencias de aminoácidos de SEQ ID
35 NOs: 144 a 186 carecen de las etiquetas (C-terminales) Strep-tag® II e His6. En una realización, la molécula de fusión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 134 o SEQ ID NO: 136.

B. Muteínas de hNGAL para uso en las moléculas de fusión de la presente invención

En algunas realizaciones, una muteína de hNGAL que se une a pioverdina (tipo I, II o III) o pioquelina puede incluir al menos una sustitución de aminoácido de un residuo de cisteína nativo (por ejemplo, el residuo de cisteína en la posición 87 de la secuencia polipeptídica lineal de NGAL humana, SEQ ID NO: 1) por otro aminoácido, por ejemplo, un residuo de serina. En algunas otras realizaciones, una muteína que se une a pioverdina o pioquelina puede incluir uno o más residuos de cisteína no nativos sustituyendo uno o más aminoácidos de hNGAL de tipo salvaje. En una realización adicional particular, una muteína de hNGAL según la descripción incluye al menos dos sustituciones de aminoácidos de un aminoácido nativo por un residuo de cisteína, para formar de esta manera uno o más puentes de cisteína. En algunas realizaciones, dicho puente de cisteína puede conectar al menos dos regiones de bucle. La definición de estas regiones se usa en la presente memoria según Flower (Flower, 1996, supra, Flower, et al., 2000, supra) y Breustedt et al. (2005, supra).

En algunas realizaciones, una muteína de hNGAL de la descripción no se une a enterobactina.

En un aspecto, la presente descripción incluye varias muteínas de hNGAL que se unen a pioverdina o pioquelina, por ejemplo, con al menos afinidad detectable. En este sentido, la pioverdina o pioquelina se considera como un ligando no natural de la hNGAL de tipo salvaje de referencia, en el que "ligando no natural" se refiere a un compuesto que no se une a lipocalina 2 humana de tipo salvaje en condiciones fisiológicas. Mediante la modificación por ingeniería de hNGAL de tipo salvaje con una o más mutaciones en determinadas posiciones de secuencia, los presentes inventores han demostrado que es posible una alta afinidad y alta especificidad para el ligando no natural, pioverdina o pioquelina. En algunas realizaciones, puede llevarse a cabo mutagénesis aleatoria en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o incluso más tripletes de nucleótidos que codifican determinadas posiciones de secuencia en lipocalina 2 humana de tipo salvaje, mediante la sustitución en estas posiciones por un subconjunto de tripletes de nucleótidos.

Las muteínas de la descripción pueden tener un residuo de aminoácido mutado en una cualquiera o más, incluyendo al menos en una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce cualquiera, de las posiciones de secuencia correspondientes a determinadas posiciones de secuencia de la secuencia polipeptídica lineal de hNGAL, tal como las posiciones de secuencia 28, 34, 36, 39-42, 44-47, 49, 52, 54-55, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134, 141 y 145 de la secuencia polipeptídica lineal de NGAL humana (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido mutado representa una sustitución conservativa o no conservativa. En algunas

realizaciones, la muteína de hNGAL comprende un residuo de aminoácido mutado en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 28, 54, 65 y 87 de la secuencia polipeptídica lineal de hNGAL madura (SEQ ID NO: 1).

- 5 Una muteína de la descripción puede incluir la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje (natural) del soporte de proteína "parental" (tal como hNGAL) fuera de las posiciones de secuencia del aminoácido mutado. En algunas realizaciones, una muteína de hNGAL según la descripción también puede portar una o más mutaciones de aminoácidos en una posición/posiciones de secuencia siempre que dicha mutación no altere, al menos
- 10 esencialmente, o no interfiera con la actividad de unión y el plegamiento de la muteína. Dichas mutaciones pueden conseguirse muy fácilmente a nivel del ADN usando métodos estándar establecidos (Sambrook, J. et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Los ejemplos ilustrativos de alteraciones de la secuencia de aminoácidos son inserciones o deleciones así como
- 15 sustituciones de aminoácidos. Dichas sustituciones pueden ser conservativas, es decir, un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido de propiedades químicas similares, en particular respecto a la polaridad así como el tamaño. Los ejemplos de sustituciones conservativas son los reemplazos entre los miembros de los grupos siguientes: 1) alanina, serina, y treonina; 2) ácido aspártico y ácido glutámico; 3) asparagina y glutamina; 4)
- 20 arginina y lisina; 5) isoleucina, leucina, metionina, y valina; y 6) fenilalanina, tirosina, y triptófano. Por otra parte, también es posible introducir alteraciones no conservativas en la secuencia de aminoácidos. Además, en lugar de reemplazar residuos únicos de aminoácidos, también es posible insertar o delecionar uno o más aminoácidos continuos de la estructura primaria de la lipocalina 2 humana siempre que estas deleciones o inserciones resulten en una
- 25 muteína plegada/funcional estable (por ejemplo, muteínas de hNGAL con extremo N y C truncado). En dicha muteína, por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos se añaden o delecionan en el extremo N o C del polipéptido. Generalmente, dicha muteína puede tener aproximadamente al menos 70%, incluyendo al menos aproximadamente 80%, tal como al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia de aminoácidos, con la secuencia de
- 30 aminoácidos de la hNGAL madura. Como un ejemplo ilustrativo, la presente descripción también engloba muteínas de hNGAL como se han definido anteriormente, en las que cuatro residuos de aminoácidos (G-N-I-K; posiciones 95-98; SEQ ID NO: 130) de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura se han delecionado (por ejemplo, SEQ ID NO: 46).
- 35 La secuencia de aminoácidos de una muteína de hNGAL descrita en la presente memoria tiene una alta identidad de secuencia con la hNGAL madura (SEQ ID NO: 1) cuando se compara con las identidades de secuencia con otras lipocalinas. En este contexto general, la secuencia de aminoácidos de una muteína de la descripción es al menos sustancialmente similar a la

secuencia de aminoácidos de la hNGAL de tipo salvaje natural, por ejemplo, con la condición de que posiblemente haya huecos (como se define más adelante) en un alineamiento que son el resultado de adiciones o deleciones de aminoácidos. Una secuencia respectiva de una muteína de la descripción, siendo sustancialmente similar a las secuencias de la hNGAL madura, tiene, en algunas realizaciones, al menos 70% de identidad u homología de secuencia, al menos 75% de identidad u homología de secuencia, al menos 80% de identidad u homología de secuencia, al menos 82% de identidad u homología de secuencia, al menos 85% de identidad u homología de secuencia, al menos 87% de identidad u homología de secuencia, o al menos 90% de identidad u homología de secuencia, incluyendo al menos 95% de identidad u homología de secuencia, con la secuencia de la hNGAL madura, por ejemplo, con la condición de que se retiene la posición o secuencia alterada y que son posibles uno o más huecos.

a) Muteínas de hNGAL específicas para pioverdina

En un aspecto, la presente descripción se refiere a muteínas de lipocalina 2 humana (Lcn2 humana o hNGAL) de unión específica específicas para un tipo de pioverdina, tal como Pvd tipo I, Pvd tipo II o Pvd tipo III.

Una realización de la presente descripción se refiere a una muteína que es capaz de unirse a un tipo de pioverdina, por ejemplo, con afinidad detectable, tal como una afinidad medida por una K_D de aproximadamente 200 nM o menor, tal como aproximadamente 150 nM o menor.

En un aspecto, la presente descripción proporciona una muteína de hNGAL que es capaz de unirse a Pvd tipo I en complejo con hierro con una K_D de aproximadamente 20 nM o menor, tal como 15 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide con un instrumento Biacore T200 en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 6.

En algunas realizaciones adicionales, una o más muteínas de hNGAL de esta descripción son capaces de unirse a Pvd tipo I succinilo, Pvd tipo I succinamida y Pvd tipo I α -cetoglutarilo con y sin hierro en complejo, con una afinidad medida por un valor CI_{50} de aproximadamente 200 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo ELISA esencialmente descrito en el Ejemplo 5.

En algunas realizaciones, la muteína es capaz de inhibir la captación de hierro mediada por pioverdina tipo I succinilo con un valor CI_{50} de aproximadamente 150 nM o menor, por ejemplo, en un formato ELISA de competición esencialmente descrito en el Ejemplo 7.

En algunas realizaciones, la muteína es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de una cepa Pvd I, por ejemplo, en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 8.

5 A este respecto, la descripción se refiere a un polipéptido (por ejemplo, un primer polipéptido como se refiere en la presente memoria), en el que dicho polipéptido comprende o consiste en una muteína de hNGAL, y dicha muteína de hNGAL en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura, comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o incluso más, residuos de aminoácidos mutados en las
10 posiciones de secuencia 28, 36, 39-41, 46, 49, 52, 54-55, 59, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132, 134 y 136, y en el que dicho polipéptido se une a Pvd tipo I, incluyendo Pvd tipo I succinilo, Pvd tipo I succinamida y Pvd tipo I α -cetoglutarilo.

En algunas realizaciones, una muteína de hNGAL que se une a Pvd tipo I de la descripción
15 incluye, en una cualquiera o más de las posiciones de secuencia 36, 40-41, 49, 52, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 y 134 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (SEQ ID NO: 1), uno o más de los residuos de aminoácidos mutados siguientes: Leu 36 $\rightarrow$ Asn, Thr, Val, Trp o Phe; Ala 40 $\rightarrow$ Gly, Asn, Thr o Phe; Ile 41 $\rightarrow$ Arg, Ala, Thr, Phe o Trp; Gln 49 $\rightarrow$ Ile, Leu, Val, Ala o Pro; Tyr 52 $\rightarrow$ Met, Trp o Pro; Ser 68 $\rightarrow$ Asp, Val o
20 Glu; Leu 70 $\rightarrow$ Gln, Trp, Asp o Thr; Arg 72 $\rightarrow$ Trp, Ala, Ser, Leu, Pro o Glu; Lys 73 $\rightarrow$ Asp, Leu, Ala, Glu o Asn; Asp 77 $\rightarrow$ Arg, Leu, Tyr, Ser, Gln, Thr, Ile o Asn; Trp 79 $\rightarrow$ Gln, Asp, Ser, Arg, Met o Glu; Arg 81 $\rightarrow$ Gln, Gly, Ile, Glu, His o Asp; Asn 96 $\rightarrow$ His, Ile, Gly, Tyr o Asp; Tyr 100 $\rightarrow$ Lys, Glu, Asn, Ser, Phe o Tyr; Leu 103 $\rightarrow$ Lys, Pro, Gln, His, Asp, Tyr, Glu, Trp o Asn; Tyr 106 $\rightarrow$ His, Gln o Phe; Lys 125 $\rightarrow$ Arg, Ser, Trp, Tyr, Val o Gly; Ser 127 $\rightarrow$ Trp, Asn, Ala, Thr, Tyr,
25 His, Ile, Val o Asp; Tyr 132 $\rightarrow$ Trp, Asn, Gly o Lys; y Lys 134 $\rightarrow$ Asn, His, Trp, Gly, Gln o Asp. En algunas realizaciones, una muteína de hNGAL de la descripción incluye dos o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o incluso más o todos los residuos de aminoácidos mutados en estas posiciones de secuencia de la hNGAL madura.

30 Además, una muteína de hNGAL que se une a Pvd tipo I según la descripción también puede comprender una o más o todas de las sustituciones siguientes en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura: Gln 28 $\rightarrow$ His; Lys 46 $\rightarrow$ Glu; Thr 54 $\rightarrow$ Val o Ala; Ile 55 $\rightarrow$ Val; Lys 59 $\rightarrow$ Arg; Asn 65 $\rightarrow$ Asp o Gln; Ile 80 $\rightarrow$ Thr; Cys 87 $\rightarrow$ Ser o Asn; y Thr 136 $\rightarrow$ Ala.

35 En algunas realizaciones adicionales, una muteína de hNGAL de la descripción, que se une a Pvd tipo I, incluye los reemplazos de aminoácidos siguientes en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura:

- (a) Gln 28 → His; Leu 36 → Asn; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Val; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Gln; Arg 81 → Gln; Cys 87 → Ser; Asn 96 → His; Tyr 100 → Lys; Leu 103 → His; Tyr 106 → His; Lys 125 → Arg; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Asp;
- 5 (b) Gln 28 → His; Leu 36 → Thr; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Phe; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Trp; Leu 70 → Trp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Tyr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ile; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → His; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Asn; Tyr 132 → Asn; Lys 134 → Gln;
- 10 (c) Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Lys; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Ala; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- 15 (d) Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Tyr; Tyr 100 → Lys; Leu 103 → Pro; Tyr 106 → Phe; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Gly;
- 20 (e) Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His;
- 25 (f) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Phe; Ile 41 → Phe; Gln 49 → Ala; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Trp; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Glu; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Tyr; Leu 103 → Tyr; Tyr 106 → His; Lys 125 → Val; Ser 127 → His; Tyr 132 → Lys; Lys 134 → Trp;
- 30 (g) Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- 35 (h) Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- (i) Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Glu; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Asp; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- (j) Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Val; Trp 79 →

Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Asn; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;

(k) Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His;

(l) Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 → Val; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;

(m) Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Lys 46 → Glu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Thr 54 → Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Glu; Ser 87 → Asn; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His;

(n) Leu 36 → Trp; Asn 39 → Asp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 → Val; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn; Thr 136 → Ala;

(o) Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 → Val; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn; Thr 136 → Ala;

(p) Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Lys 46 → Glu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Thr 54 → Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Glu; Ser 87 → Asn; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His; o

(q) Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Lys 46 → Glu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Thr 54 → Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Glu; Ser 87 → Asn; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His.

En la región residual, es decir, la región que se diferencia de las posiciones de secuencia 28, 36, 39-41, 46, 49, 52, 54-55, 59, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132, 134 y 136, una muteína de hNGAL de la descripción puede incluir la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje (natural) fuera de las posiciones de secuencia de aminoácidos mutadas.

En realizaciones adicionales particulares, una muteína según la presente descripción comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2-18 o un fragmento o variante de éstas.

La secuencia de aminoácidos de una muteína de hNGAL que se une a Pvd tipo I de la descripción puede tener una alta identidad de secuencia, tal como al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 82%, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90% de identidad, incluyendo al menos 95% de identidad, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2-18.

La descripción también incluye homólogos estructurales de una muteína de hNGAL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2-18, homólogos estructurales que tienen una homología de secuencia de aminoácidos o identidad de secuencia de más de aproximadamente 60%, particularmente más de 65%, más de 70%, más de 75%, más de 80%, más de 85%, más de 90%, más de 92% y lo más particularmente más de 95% en relación con dicha muteína de hNGAL.

Una muteína de hNGAL que se une a Pvd tipo I según la presente descripción puede obtenerse mediante mutagénesis de una forma natural de lipocalina 2 humana. En algunas realizaciones de la mutagénesis, una sustitución (o reemplazo) es una sustitución conservativa. No obstante, se considera cualquier sustitución - incluyendo sustitución no conservativa o una o más de las sustituciones ejemplares siguientes - siempre que la muteína retenga su capacidad de unirse a Pvd tipo I, y/o tenga una identidad con la secuencia entonces sustituida en que es al menos 60%, tal como al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85% o una identidad mayor con la secuencia de aminoácidos de la lipocalina 2 humana madura (Número de Acceso del Banco de Datos SWISS-PROT P80188).

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una muteína de hNGAL que se une a Pvd tipo II en complejo con hierro con una K_D de aproximadamente 20 nM o menor, tal como 5 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide con un instrumento Biacore T200 en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 6.

En algunas realizaciones adicionales más, una o más muteínas de hNGAL de esta descripción son capaces de unirse a Pvd tipo II succinilo, Pvd tipo II succinamida y Pvd tipo II α -cetoglutarilo con y sin hierro en complejo, con una afinidad medida por un valor CI_{50} de aproximadamente 200 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo ELISA esencialmente descrito en el Ejemplo 5.

En algunas realizaciones, la muteína es capaz de inhibir la captación de hierro mediada por pioverdina tipo II succinilo con un valor CI_{50} de aproximadamente 150 nM o menor, por ejemplo, en un formato ELISA de competición esencialmente descrito en el Ejemplo 7.

En algunas realizaciones, la muteína es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de una cepa Pvd II, por ejemplo, en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 8.

En algunas otras realizaciones, la muteína es capaz de inhibir o disminuir el crecimiento de cepas de *P. aeruginosa* que expresan pioverdina tipo II, por ejemplo, en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 10.

A este respecto, la descripción se refiere a un polipéptido (por ejemplo, un segundo polipéptido como se refiere en la presente memoria), en el que dicho polipéptido comprende o consiste en una muteína de hNGAL, y dicha muteína de hNGAL en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura, comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o incluso más, residuos de aminoácidos mutados en las posiciones de secuencia 28, 36, 40-41, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 y 134, y en el que dicho polipéptido se une a Pvd tipo II.

En algunas realizaciones, una muteína de hNGAL que se une a Pvd tipo II de la descripción incluye, en una cualquiera o más de las posiciones de secuencia 36, 40-41, 49, 52, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 y 134 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (SEQ ID NO: 1), uno o más de los residuos de aminoácidos mutados siguientes: Leu 36 $\rightarrow$ Asn, Ile o Val; Ala 40 $\rightarrow$ Glu, Gly, Asn, Thr o His; Ile 41 $\rightarrow$ Arg, Val o Thr; Gln 49 $\rightarrow$ Gly, Ala o Pro; Tyr 52 $\rightarrow$ Asn, Gly, Trp o Pro; Ser 68 $\rightarrow$ Asp, Arg o Glu; Leu 70 $\rightarrow$ Arg o Trp; Arg 72 $\rightarrow$ His, Ile, Ala, Ser o Gly; Lys 73 $\rightarrow$ Asn, Met, Pro, Phe, Gln o Arg; Asp 77 $\rightarrow$ His, Ile, Met, Lys, Gly o Asn; Trp 79 $\rightarrow$ Ser, Tyr, Ala, Asp, Phe o Trp; Arg 81 $\rightarrow$ Glu, Ser, Tyr o Asp; Asn 96 $\rightarrow$ Met, Ile, Arg, Asp, Lys, Asn o Ala; Tyr 100 $\rightarrow$ Lys, Glu, Asn, Ser, Phe o Tyr; Leu 103 $\rightarrow$ Thr, Ile, Gln, Gly, Met, His, Trp o Val; Tyr 106 $\rightarrow$ Met, Gln, Ala, Ile, Asn, Gly, Met o Phe; Lys 125 $\rightarrow$ Ala, Ile o Asn; Ser 127 $\rightarrow$ Lys, Arg, Ser, Met, Asp o Asn; Tyr 132 $\rightarrow$ Met, Phe, Asn, Ala, Ile, Gly o Val; y Lys 134 $\rightarrow$ Trp o Tyr. En algunas realizaciones, una muteína de hNGAL de la

descripción incluye dos o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o incluso más o todos los residuos de aminoácidos mutados en estas posiciones de secuencia de la hNGAL madura.

Además, una muteína de hNGAL que se une a Pvd tipo II según la descripción también puede comprender una o más o todas de las sustituciones siguientes en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura: Gln 28 → His; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Asp o Gln y Cys 87 → Ser.

En algunas realizaciones adicionales, una muteína de hNGAL de la descripción, que se une a Pvd tipo II, incluye los reemplazos de aminoácidos siguientes en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura:

(a) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Glu; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Met; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;

(b) Gln 28 → His; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Met; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ile; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Met; Lys 134 → Trp;

(c) Gln 28 → His; Leu 36 → Ile; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Met; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Ala; Lys 125 → Lys; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Trp;

(d) Gln 28 → His; Ala 40 → Asn; Gln 49 → Ala; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Met; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Tyr; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Ile; Lys 125 → Lys; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

(e) Gln 28 → His; Ala 40 → His; Gln 49 → Ala; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Trp; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Phe; Lys 125 → Ala; Ser 127 → Asp; Tyr 132 → Asn; Lys 134 → Trp;

(f) Gln 28 → His; Leu 36 → Asn; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Arg; Leu 70 → Trp; Arg 72 → Asn; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Thr; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Asn; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Tyr;

(g) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Gly; Trp 79 →

- Trp; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Ile; Tyr 106 → Gly; Lys 125 → Lys; Ser 127 → Asn; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Trp;
- (h) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Glu; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Val; Tyr 106 → Met; Lys 125 → Asn; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- (i) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Met; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Trp;
- (j) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Phe; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Met; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Trp;
- (k) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Trp; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → His; Tyr 106 → Met; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- (l) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Phe; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp;
- (m) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp;
- (n) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Glu; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Phe; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Val; Tyr 106 → Met; Lys 125 → Asn; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- (o) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Glu; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Phe; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Val; Tyr 106 → Met; Lys 125 → Asn; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- (p) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 →

Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp;

(q) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp;

(r) Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp; o

(s) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp.

En la región residual, es decir, la región que se diferencia de las posiciones de secuencia 28, 36, 40-41, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 y 134, una muteína de hNGAL de la descripción puede incluir la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje (natural) fuera de las posiciones de secuencia de aminoácidos mutadas.

En realizaciones adicionales particulares, una muteína según la presente descripción comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 19-37 o un fragmento o variante de éstas.

La secuencia de aminoácidos de una muteína de hNGAL que se une a Pvd tipo II de la descripción puede tener una alta identidad de secuencia, tal como al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 82%, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90% de identidad, incluyendo al menos 95% de identidad, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 19-37.

La descripción también incluye homólogos estructurales de una muteína de hNGAL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 19-37, homólogos estructurales que tienen una homología de secuencia de aminoácidos o identidad de secuencia de más de aproximadamente 60%, particularmente más de 65%, más de 70%, más de 75%, más de 80%, más de 85%, más de 90%, más de 92% y lo más particularmente más de 95% en relación con dicha muteína de hNGAL.

Una muteína de hNGAL que se une a Pvd tipo II según la presente descripción puede obtenerse mediante mutagénesis de una forma natural de lipocalina 2 humana. En algunas realizaciones de la mutagénesis, una sustitución (o reemplazo) es una sustitución conservativa. No obstante, se considera cualquier sustitución - incluyendo sustitución no conservativa o una o más de las sustituciones ejemplares siguientes - siempre que la muteína retenga su capacidad de unirse a Pvd tipo I, y/o tenga una identidad con la secuencia entonces sustituida en que es al menos 60%, tal como al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85% o una identidad mayor con la secuencia de aminoácidos de la lipocalina 2 humana madura (Número de Acceso del Banco de Datos SWISS-PROT P80188).

En otro aspecto más, la presente descripción proporciona una muteína de hNGAL que se une a Pvd tipo III en complejo con hierro con una K_D de aproximadamente 20 nM o menor, tal como 10 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide con un instrumento Biacore T200 en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 6.

En algunas realizaciones adicionales más, una o más muteínas de hNGAL de esta descripción son capaces de unirse a Pvd tipo III succinilo, Pvd tipo III succinamida y Pvd tipo III α -cetoglutarilo con y sin hierro en complejo, con una afinidad medida por un valor CI_{50} de aproximadamente 200 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo ELISA esencialmente descrito en el Ejemplo 5.

En algunas realizaciones, la muteína es capaz de inhibir la captación de hierro mediada por pioverdina tipo III con un valor CI_{50} de aproximadamente 150 nM o menor, por ejemplo, en un formato ELISA de competición esencialmente descrito en el Ejemplo 7.

En algunas realizaciones, la muteína es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de una cepa Pvd III, por ejemplo, en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 8.

A este respecto, la descripción se refiere a un polipéptido (por ejemplo, un tercer polipéptido como se refiere en la presente memoria), en el que dicho polipéptido comprende o consiste en una muteína de hNGAL, y dicha muteína de hNGAL en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura, comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o incluso más, residuos de aminoácidos mutados en las posiciones de secuencia 28, 36, 40-42, 45-47, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105-106, 125, 127, 132 134 y 145, y en el que dicho polipéptido se une a Pvd tipo III.

En algunas realizaciones, una muteína de hNGAL que se une a Pvd tipo III de la descripción incluye, en una cualquiera o más de las posiciones de secuencia 36, 40-41, 49, 52, 68, 70, 72-

73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 y 134 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (SEQ ID NO: 1), uno o más de los residuos de aminoácidos mutados siguientes: Leu 36 → Phe or Glu; Ala 40 → Trp, Leu o Arg; Ile 41 → Met, Arg, Ala, Leu o Trp; Gln 49 → His, Ile, Arg, Lys, Met o Pro; Tyr 52 → Asn, Tyr, Arg, Ser o Met; Ser 68 → Asp, Asn, Glu o Gln; Leu 70 → Lys, Asn o Arg; Arg 72 → Leu, Arg, Gln o Tyr; Lys 73 → His, Leu, Ala, Pro, Gln o Tyr; Asp 77 → Ala, Ile, Lys, Gln o Arg; Trp 79 → Ser o Asp; Arg 81 → His, Ala, Ser o Val; Asn 96 → Met, Ile, Arg, Gly, Leu o Val; Tyr 100 → Ala, Ile, Asn, Pro o Asp; Leu 103 → Gln, Gly, Phe o Pro; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp o Thr; Ser 127 → Val, His, Ile, Phe o Ala; Tyr 132 → Phe; y Lys 134 → Trp, Gln o Glu. En algunas realizaciones, una muteína de hNGAL de la descripción incluye dos o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o incluso más o todos los residuos de aminoácidos mutados en estas posiciones de secuencia de la hNGAL madura.

Además, una muteína de hNGAL que se une a Pvd tipo III según la descripción también puede comprender una o más o todas de las sustituciones siguientes en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura: Gln 28 → His; Leu 42 → Arg; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Asp 47 → Asn; Asn 65 → Asp; Cys 87 → Ser; Ser 105 → Pro y Thr 145 → Pro.

En algunas realizaciones adicionales, una muteína de hNGAL de la descripción, que se une a Pvd tipo III, incluye los reemplazos de aminoácidos siguientes en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura:

- (a) Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Trp; Ile 41 → Met; Gln 49 → His; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Gln; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ile; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp; Ser 127 → His; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Gln;
- (b) Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Arg; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Tyr; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Asn; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Ala; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Ile; Leu 103 → Pro; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Thr; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;
- (c) Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Leu; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Arg; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Tyr; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ala; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ala; Leu 103 → Phe; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Ala; Lys 134 → Glu;
- (d) Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Trp; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Met; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;

- (e) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Lys; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Ala; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- 5 (f) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- 10 (g) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Val; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- 15 (h) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- 20 (i) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Lys; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → Tyr; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → -; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- 25 (j) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Leu 42 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- 30 (k) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp 47 → Asn; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp; Thr 145 → Pro;
- 35 (l) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- (m) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Leu 42 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu

103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

(n) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp 47 → Asn; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp; Thr 145 → Pro;

(o) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp; o

(p) Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Leu 42 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp.

En la región residual, es decir, la región que se diferencia de las posiciones de secuencia 28, 36, 40-42, 45-47, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105-106, 125, 127, 132, 134 y 145, una muteína de hNGAL de la descripción puede incluir la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje (natural) fuera de las posiciones de secuencia de aminoácidos mutadas.

En realizaciones adicionales particulares, una muteína según la presente descripción comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 38-53 o un fragmento o variante de éstas.

La secuencia de aminoácidos de una muteína de hNGAL que se une a Pvd tipo III de la descripción puede tener una alta identidad de secuencia, tal como al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 82%, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90% de identidad, incluyendo al menos 95% de identidad, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 38-53.

La descripción también incluye homólogos estructurales de una muteína de hNGAL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 38-53, homólogos estructurales que tienen una homología de secuencia de aminoácidos o identidad de secuencia de más de aproximadamente 60%, particularmente más de 65%, más de 70%, más de 75%, más de 80%, más de 85%, más de 90%, más de 92% y lo más particularmente más de 95% en relación con dicha muteína de hNGAL.

Una muteína de hNGAL que se une a Pvd tipo III según la presente descripción puede obtenerse mediante mutagénesis de una forma natural de lipocalina 2 humana. En algunas realizaciones de la mutagénesis, una sustitución (o reemplazo) es una sustitución conservativa.

- 5 No obstante, se considera cualquier sustitución - incluyendo sustitución no conservativa o una o más de las sustituciones ejemplares siguientes - siempre que la muteína retenga su capacidad de unirse a Pvd tipo I, y/o tenga una identidad con la secuencia entonces sustituida en que es al menos 60%, tal como al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85% o una identidad mayor con la secuencia de aminoácidos de la lipocalina 2 humana madura (Número de Acceso del Banco de Datos SWISS-PROT P80188).
- 10

b) Aplicaciones de las muteínas específicas para pioverdina

- Por lo tanto, existen en medicina numerosas aplicaciones posibles para las muteínas que se unen a pioverdina de la descripción. En un aspecto adicional, la descripción se refiere al uso de una muteína que se une a pioverdina descrita en la presente memoria para detectar pioverdina (tipo I, II o III) en una muestra así como a un método respectivo de diagnóstico.
- 15

- La presente descripción también implica el uso de una o más muteínas que se unen a pioverdina como se describe para la formación de complejo con pioverdina (tipo I, II o III).
- 20

- Por lo tanto, en otro aspecto de la descripción, las muteínas descritas se usan para la detección de pioverdina (tipo I, II o III). Dicho uso puede incluir las etapas de poner en contacto una o más de dichas muteínas, en condiciones adecuadas, con una muestra que se sospecha que contiene pioverdina, permitiendo de esta manera la formación de un complejo entre las muteínas y pioverdina (tipo I, II o III), y detectar el complejo mediante una señal adecuada.
- 25

- La señal detectable puede causarse por un marcaje, como se ha explicado anteriormente, o por un cambio de las propiedades físicas debido a la unión, es decir, la formación del complejo, en sí mismo. Un ejemplo es la resonancia de plasmón superficial, cuyo valor cambia durante la unión de parejas de unión de las cuales una está inmovilizada en una superficie tal como una lámina de oro.
- 30

- Las muteínas que se unen a pioverdina descritas en la presente memoria también pueden usarse para la separación de pioverdina (tipo I, II o III). Dicho uso puede incluir las etapas de poner en contacto una o más de dichas muteínas, en condiciones adecuadas, con una muestra que se supone que contiene pioverdina (tipo I, II y/o III), permitiendo de esta manera la formación de un complejo entre las muteínas y pioverdina (tipo I, II o III), y separar el complejo
- 35

de la muestra.

En el uso de las muteínas descritas para la detección de pioverdina así como la separación de pioverdina (tipo I, II o III), las muteínas y/o la pioverdina o un dominio o fragmento de éstas
5 puede inmovilizarse en una fase sólida adecuada.

En otro aspecto más, la presente descripción presenta un kit de diagnóstico o analítico que comprende una muteína que se une a pioverdina según la descripción.

10 Además de su uso en diagnóstico, en otro aspecto más, la descripción engloba el uso de una muteína que se une a pioverdina de la descripción o una composición que comprende dicha muteína para la unión de pioverdina (tipo I, II o III) en un sujeto y/o inhibir o disminuir el crecimiento de *P. aeruginosa* en un sujeto.

15 En otro aspecto más, la presente descripción presenta un método de unión de pioverdina (tipo I, II o III) en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una o más muteínas que se unen a pioverdina de la descripción o de una o más composiciones que comprenden dichas muteínas.

20 En otro aspecto más, la presente descripción implica un método para inhibir o disminuir el crecimiento de *P. aeruginosa* en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una o más muteínas que se unen a pioverdina de la descripción o de una o más composiciones que comprenden dichas muteínas.

25 c) Muteínas de hNGAL específicas para pioquelina

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una muteína de hNGAL que se une a pioquelina en complejo con hierro con una K_D de aproximadamente 20 nM o menor, tal como 1 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide con un instrumento Biacore T200 en un ensayo
30 esencialmente descrito en el Ejemplo 6.

En algunas realizaciones adicionales más, una o más muteínas de hNGAL de esta descripción son capaces de unirse a pioquelina con hierro en complejo, con una afinidad medida por un valor CI_{50} de aproximadamente 500 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo
35 ELISA esencialmente descrito en el Ejemplo 5.

En algunas realizaciones adicionales más, una o más muteínas de hNGAL de esta descripción son capaces de unirse a pioquelina sin hierro en complejo, con una afinidad medida por un

valor CI_{50} de aproximadamente 200 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo ELISA esencialmente descrito en el Ejemplo 5.

5 En algunas realizaciones adicionales más, una o más muteínas de hNGAL de esta descripción son capaces de unirse a pioquelina con y sin hierro en complejo, con una afinidad medida por un valor CI_{50} de aproximadamente 200 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo ELISA esencialmente descrito en el Ejemplo 5.

10 En algunas realizaciones, la muteína es capaz de inhibir la captación de hierro mediada por pioquelina con un valor CI_{50} de aproximadamente 150 nM o menor, por ejemplo, en un formato ELISA de competición esencialmente descrito en el Ejemplo 7.

15 En algunas realizaciones, la muteína es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de Pvd I inactivada ($\Delta pvdA$), por ejemplo, en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 8.

A este respecto, la descripción se refiere a un polipéptido (por ejemplo, un cuarto polipéptido como se refiere en la presente memoria), en el que dicho polipéptido comprende o consiste en una muteína de hNGAL, y dicha hNGAL en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura, comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,
20 17, 18, 19, 20, 21, o incluso más, residuos de aminoácidos mutados en las posiciones de secuencia 28, 34, 36, 40-41, 44-46, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134 y 141, y en el que dicho polipéptido se une a pioquelina.

En algunas realizaciones, una muteína de hNGAL que se une a pioquelina de la descripción
25 incluye, en una cualquiera o más de las posiciones de secuencia 36, 40-41, 49, 52, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 y 134 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (SEQ ID NO: 1), uno o más de los residuos de aminoácidos mutados siguientes: Leu 36 → His, Met o Val; Ala 40 → Ile, Gln, Tyr o Phe; Ile 41 → Leu, His o Trp; Gln 49 → His, Arg, Ser o Ala; Tyr 52 → Leu, Trp o Pro; Ser 68 → Asp o His; Leu 70 → Arg o Trp;
30 Arg 72 → His, Ile, Ala, Ser o Gly; Lys 73 → Asn, Met, Pro, Phe, Gln o Arg; Asp 77 → Arg, Thr, Pro o Asp; Trp 79 → Ala, Arg, Lys o Asp; Arg 81 → Thr, Ile o Trp; Asn 96 → Met, Asn, Pro o Ala; Tyr 100 → Gly, His o Glu; Leu 103 → Gly, Met, His o Gln; Tyr 106 → Met, Gly, Arg o Trp; Lys 125 → Trp, Phe, Gly o Leu; Ser 127 → Arg, Trp, Asp o Ile; Tyr 132 → Ala, Glu o Thr; y Lys 134 → Leu, Val, Asn o Phe. En algunas realizaciones, una muteína de hNGAL de la
35 descripción incluye dos o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o incluso más o todos los residuos de aminoácidos mutados en estas posiciones de secuencia de la hNGAL madura.

Además, una muteína de hNGAL que se une a pioquelina según la descripción también puede comprender una o más o todas de las sustituciones siguientes en comparación con la

secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura: Gln 28 → His; Val 34 → Leu; Glu 44 → Gly; Asp 45 → Gly; Lys → Arg o Tyr; Asn 65 → Asp; Ile 80 → Thr; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Val 108 → Ala; Phe 123 → Ser y Thr 141 → Ala.

5 En algunas realizaciones adicionales, una muteína de hNGAL de la descripción, que se une a pioquelina, incluye los reemplazos de aminoácidos siguientes en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura:

- (a) Gln 28 → His; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Leu; Ser 68 → His; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Lys; Lys 73 → Trp; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Met; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → His; Tyr 106 → Met; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Asp; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Leu;
- (b) Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Asp 77 → His; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe;
- (c) Gln 28 → His; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe; Ile 41 → His; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → His; Leu 70 → Pro; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ala; Trp 79 → Lys; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Trp; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thru; Lys 134 → Val;
- (d) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Ala; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Pro; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Arg; Lys 125 → Leu; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Asn;
- (e) Gln 28 → His; Val 34 → Leu; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe; Ile 41 → His; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → His; Leu 70 → Pro; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ala; Trp 79 → Lys; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Trp; Phe 123 → Ser; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thru; Lys 134 → Val; Thr 141 → Ala;
- (f) Gln 28 → His; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe; Ile 41 → His; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → His; Leu 70 → Pro; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ala; Trp 79 → Lys; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Trp; Phe 123 → Ser; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thru; Lys 134 → Val;
- (g) Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe;

(h) Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Glu 44 → Gly; Lys 46 → Tyr; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Lys 74 → Glu; Asp 77 → His; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Val 108 → Ala; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe; o

(i) Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe.

En la región residual, es decir, la región que se diferencia de las posiciones de secuencia 28, 34, 36, 40-41, 44-46, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134 y 141, una muteína de hNGAL de la descripción puede incluir la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje (natural) fuera de las posiciones de secuencia de aminoácidos mutados.

En realizaciones adicionales particulares, una muteína según la presente descripción comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 54-63 o un fragmento o variante de éstas.

La secuencia de aminoácidos de una muteína de hNGAL que se une a pioquelina de la descripción puede tener una alta identidad de secuencia, tal como al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 82%, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90% de identidad, incluyendo al menos 95% de identidad, con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 54-63.

La descripción también incluye homólogos estructurales de una muteína de hNGAL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 54-63, homólogos estructurales que tienen una homología de secuencia de aminoácidos o identidad de secuencia de más de aproximadamente 60%, particularmente más de 65%, más de 70%, más de 75%, más de 80%, más de 85%, más de 90%, más de 92% y lo más particularmente más de 95% en relación con dicha muteína de hNGAL.

Una muteína de hNGAL que se une a pioquelina según la presente descripción puede obtenerse mediante mutagénesis de una forma natural de lipocalina 2 humana. En algunas realizaciones de la mutagénesis, una sustitución (o reemplazo) es una sustitución conservativa. No obstante, se considera cualquier sustitución - incluyendo sustitución no conservativa o una o más de las sustituciones ejemplares siguientes - siempre que la muteína retenga su

capacidad de unirse a Pvd tipo I, y/o tenga una identidad con la secuencia entonces sustituida en que es al menos 60%, tal como al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85% o una identidad mayor con la secuencia de aminoácidos de la lipocalina 2 humana madura (Número de Acceso del Banco de Datos SWISS-PROT P80188).

5

d) Aplicaciones de las muteínas específicas para pioquelina

Por lo tanto, existen en medicina numerosas aplicaciones posibles para las muteínas con afinidad de unión para pioquelina de la descripción. En un aspecto adicional, la descripción se
10 refiere al uso de dicha muteína descrita en la presente memoria para detectar pioquelina en una muestra así como a un método respectivo de diagnóstico.

La presente descripción también implica el uso de una o más muteínas con afinidad de unión para pioquelina como se describe para la formación de complejo con pioquelina.

15

Por lo tanto, en otro aspecto de la descripción, las muteínas descritas se usan para la detección de pioquelina. Dicho uso puede incluir las etapas de poner en contacto una o más de dichas muteínas, en condiciones adecuadas, con una muestra que se sospecha que contiene pioquelina, permitiendo de esta manera la formación de un complejo entre las muteínas y
20 pioquelina, y detectar el complejo mediante una señal adecuada.

La señal detectable puede causarse por un marcaje, como se ha explicado anteriormente, o por un cambio de las propiedades físicas debido a la unión, es decir, la formación del complejo, en sí mismo. Un ejemplo es la resonancia de plasmón superficial, cuyo valor cambia durante la unión de parejas de unión de las cuales una está inmovilizada en una superficie tal como una
25 lámina de oro.

Las muteínas descritas en la presente memoria también pueden usarse para la separación de pioquelina. Dicho uso puede incluir las etapas de poner en contacto una o más de dichas muteínas, en condiciones adecuadas, con una muestra que se supone que contiene pioquelina,
30 permitiendo de esta manera la formación de un complejo entre las muteínas y pioquelina, y separar el complejo de la muestra.

En el uso de las muteínas descritas para la detección de pioquelina así como la separación de pioquelina, las muteínas y/o la pioquelina o un dominio o fragmento de éstas puede
35 inmovilizarse en una fase sólida adecuada.

De acuerdo con esto, puede determinarse la presencia o ausencia de una molécula tal como pioquelina, por ejemplo, en una muestra, así como su concentración o nivel.

En otro aspecto más, la presente descripción presenta un kit de diagnóstico o analítico que comprende una muteína con afinidad de unión para pioquelina según la descripción.

- 5 Además de su uso en diagnóstico, en otro aspecto más, la descripción engloba el uso de dicha muteína de la descripción o una composición que comprende dicha muteína para la unión de pioquelina en un sujeto y/o inhibir o disminuir el crecimiento de *P. aeruginosa* en un sujeto.

- 10 En otro aspecto más, la presente descripción presenta un método de unión de pioquelina en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una o más muteínas con afinidad de unión para pioquelina de la descripción o de una o más composiciones que comprenden dicha muteína.

- 15 En otro aspecto más, la presente descripción implica un método para inhibir o disminuir el crecimiento de *P. aeruginosa* en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una o más muteínas con afinidad de unión para pioquelina de la descripción o de una o más composiciones que comprenden dicha muteína.

- e) Composiciones que comprenden muteínas que se unen a pioverdina y/o muteínas que se unen a pioquelina y combinaciones de las muteínas

- 20 La presente descripción engloba el uso de (i) una primera muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo I, (ii) una segunda muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo II, (iii) una tercera muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo III y/o (iv) una cuarta muteína o polipéptido de ésta específico para pioquelina para la unión de
- 25 pioverdina tipo I, II, III y/o pioquelina en un sujeto. Dicho uso incluye una etapa de administrar a un sujeto una cantidad efectiva de (i) una primera muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo I, (ii) una segunda muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo II, (iii) una tercera muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo III y/o (iv) una cuarta muteína o polipéptido de ésta específico para pioquelina. La presente descripción
- 30 también contempla el uso de (i) una primera muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo I, (ii) una segunda muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo II, (iii) una tercera muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo III y/o (iv) una cuarta muteína o polipéptido de ésta específico para pioquelina para prevenir o reducir la captación de hierro por *P. aeruginosa* a través de pioquelina y/o pioverdina en un sujeto. De
- 35 manera similar, la presente descripción describe el uso de (i) una primera muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo I, (ii) una segunda muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo II, (iii) una tercera muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo III y/o (iv) una cuarta muteína o polipéptido de ésta específico para pioquelina

para el tratamiento o alivio de una infección y/o formación de biopelícula por *P. aeruginosa* en un sujeto. En algunas realizaciones adicionales, la infección por *P. aeruginosa* puede ser infecciones agudas o crónicas.

- 5 La primera, segunda, tercera y/o cuarta muteínas o polipéptidos de éstas pueden administrarse en combinación, incluyendo concurrentemente, concomitantemente o en serie. En algunas realizaciones, la primera, segunda, tercera y/o cuarta muteínas o polipéptidos de éstas pueden estar incluidas en una composición que puede administrarse. La composición puede incluir una cantidad efectiva de la primera, segunda, tercera y/o cuarta muteínas o polipéptidos de éstas
- 10 como ingredientes activos, en asociación con al menos un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. La primera, segunda, tercera y/o cuarta muteínas o polipéptidos de éstas también pueden administrarse independientemente una de otra, incluyendo a intervalos individuales a puntos de tiempo independientes.
- 15 En algunas realizaciones, la muteína específica para pioverdina (tipo I, II o III) como se usa en la descripción es capaz de unirse a pioverdina (tipo I, II o III, respectivamente), por ejemplo, con una afinidad detectable, es decir, con una constante de disociación de aproximadamente 200 nM o menor, o aproximadamente 100 nM o menor, o aproximadamente 50 nM o menor, o aproximadamente 25 nM o menor, o aproximadamente 15 nM o menor. En algunas
- 20 realizaciones, la muteína específica para pioquelina como se usa en la descripción es capaz de unirse a pioquelina, por ejemplo, con una afinidad detectable, es decir, con una constante de disociación de aproximadamente 200 nM o menor, o aproximadamente 100 nM o menor, o aproximadamente 50 nM o menor, o aproximadamente 25 nM o menor, o aproximadamente 15 nM o menor. En algunas realizaciones adicionales preferidas, una muteína de la
- 25 combinación según la descripción se une a pioverdina (tipo I, II o III) o pioquelina, respectivamente, con una constante de disociación para pioverdina (tipo I, II o III, respectivamente) o pioquelina de aproximadamente 10 nM o menor, o aproximadamente 1 nM o menor, o aproximadamente 0,1 nM o menor, o aproximadamente 10 pM o menor. La presente descripción, así, proporciona una combinación de (i) una muteína de hNGAL que se
- 30 une a pioverdina tipo I (Pvd I s, sa, α KG +/-Fe), (ii) una muteína de hNGAL que se une a pioverdina tipo II (Pvd II s, sa, α KG +/-Fe), (iii) una muteína de hNGAL que se une a pioverdina tipo III (Pvd III s, sa, α KG +/-Fe) y/o (iv) una muteína de hNGAL que se une a pioquelina (Pch +/- Fe).
- 35 Los detalles adicionales sobre muteínas de hNGAL que se unen a pioverdina pueden encontrarse en la sección anterior a) de la presente descripción.

En una realización particular, una muteína que es específica para pioverdina tipo I se muestra

en una cualquiera de SEQ ID NOs: 2-18. En una realización particular, una muteína que es específica para pioverdina tipo II se muestra en una cualquiera de SEQ ID NOs: 19-37. En una realización particular, una muteína que es específica para pioverdina tipo III se muestra en una cualquiera de SEQ ID NOs: 38-53.

5

Los detalles adicionales de muteínas de hNGAL que se unen a pioquelina se han descrito en la sección anterior c) de la presente descripción.

En una realización particular, la muteína que es específica para pioquelina se muestra en una cualquiera de SEQ ID NOs: 54-63.

10

La presente descripción también se refiere a una composición que comprende al menos uno de los siguientes: (i) una primera muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo I, (ii) una segunda muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo II, (iii) una tercera muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo III y (iv) una cuarta muteína o polipéptido de ésta específico para pioquelina, composición que puede usarse en un método de unión de pioverdina tipo I, II, III y/o pioquelina.

15

20

25

30

La presente descripción se refiere a una combinación de una primera muteína o polipéptido o composición de ésta, una segunda muteína o polipéptido o composición de ésta, una tercera muteína o polipéptido o composición de ésta, y/o una cuarta muteína o polipéptido o composición de ésta. Una de estas muteínas puede unirse a pioverdina (tipo I, II o III) como una diana no natural dada, por ejemplo, con afinidad detectable. Una de estas muteínas puede unirse a pioquelina como una diana no natural dada, por ejemplo, con afinidad detectable. La muteína respectiva se une así a pioverdina tipo I, II, III o pioquelina, respectivamente, como una diana no natural dada. El término "diana no natural" se refiere a un compuesto, que no se une a la lipocalina correspondiente (la hNGAL de tipo salvaje) en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, la primera muteína o polipéptido o composición de ésta puede unirse a un tipo de pioverdina (tipo I, II o III) o pioquelina y la segunda, la tercera o la cuarta muteína o polipéptido o composición de ésta puede unirse a pioquelina o a otro tipo de pioverdina respectivamente, o vice versa. La combinación de la primera, la segunda, la tercera y/o la cuarta muteínas o polipéptidos o composiciones de éstas puede proporcionarse en varias formas y orientaciones.

35

En otro aspecto más, la presente descripción presenta un método de unión a pioverdina tipo I, II, III y/o pioquelina en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una composición que comprende al menos uno de los siguientes: (i) una muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo I, (ii) una muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo II, (iii) una muteína o polipéptido de ésta específico para

pioverdina tipo III y (iv) una muteína o polipéptido de ésta específico para pioquelina. En algunas realizaciones, dicha composición comprende dos o más, por ejemplo, tres o incluso todas de (i)-(iv).

- 5 En otro aspecto más, la presente descripción implica un método para inhibir o disminuir el crecimiento de *P. aeruginosa* en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una composición que comprende al menos uno de los siguientes: (i) una muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo I, (ii) una muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo II, (iii) una muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo III y (iv) una muteína o polipéptido de ésta específico para pioquelina. En algunas realizaciones, dicha composición comprende dos o más, por ejemplo, tres o incluso todas de (i)-(iv).

- 15 La presente descripción también implica el uso de (i) una primera muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo I, (ii) una segunda muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo II, (iii) una tercera muteína o polipéptido de ésta específico para pioverdina tipo III y/o (iv) una cuarta muteína o polipéptido de ésta específico para pioquelina, para la formación de complejo con pioverdina tipo I, II, III y/o pioquelina.

- 20 Por lo tanto, en otro aspecto de la descripción, las muteínas o polipéptidos descritos pueden usarse para la detección de pioverdina y pioquelina. Dicho uso puede incluir las etapas de poner en contacto una o más de dichas muteínas o polipéptidos, en condiciones adecuadas, con una muestra que se sospecha que contiene pioverdina y/o pioquelina, permitiendo de esta manera la formación de un complejo entre las muteínas o polipéptidos y pioverdina y/o entre las muteínas y pioquelina, respectivamente, y detectar el complejo mediante una señal adecuada.

- 30 La señal detectable puede causarse por un marcaje, como se ha explicado anteriormente, o por un cambio de las propiedades físicas debido a la unión, es decir, la formación del complejo, en sí mismo. Un ejemplo es la resonancia de plasmón superficial, cuyo valor cambia durante la unión de parejas de unión de las cuales una está inmovilizada en una superficie tal como una lámina de oro.

- 35 Las muteínas o polipéptidos descritas en la presente memoria también pueden usarse para la separación de pioverdina y/o pioquelina. Dicho uso puede incluir las etapas de poner en contacto una o más de dichas muteínas, en condiciones adecuadas, con una muestra que se supone que contiene pioverdina y/o pioquelina, permitiendo de esta manera la formación de un complejo entre las muteínas y pioverdina y/o entre las muteínas y pioquelina, respectivamente,

y separar el complejo de la muestra.

En el uso de las muteínas o polipéptidos descritos para la detección de pioverdina y/o pioquelina así como la separación de pioverdina y/o pioquelina, las muteínas y/o pioverdina y
5 pioquelina o un dominio o fragmento de éstas puede inmovilizarse en una fase sólida adecuada.

De acuerdo con esto, puede determinarse la presencia o ausencia de pioverdina y/o pioquelina, por ejemplo, en una muestra, así como su concentración o nivel.

10

En otro aspecto, la descripción proporciona un kit de partes. El kit incluye, en uno o más contenedores, separadamente o en mezcla, una muteína o polipéptido específico para pioverdina tipo I o composición de ésta, una muteína o polipéptido específico para pioverdina tipo II o composición de ésta, una muteína o polipéptido específico para pioverdina tipo III o composición de ésta, y/o una muteína o polipéptido específico para pioquelina o composición de ésta. En
15 algunas realizaciones adicionales preferidas, el kit comprende un primer contenedor que incluye una primera muteína o polipéptido específico para pioverdina tipo I o composición de ésta, un segundo contenedor que incluye una segunda muteína o polipéptido específico para pioverdina tipo II o composición de ésta, un tercer contenedor que incluye una tercera muteína o polipéptido
20 específico para pioverdina tipo III o composición de ésta, y/o un cuarto contenedor que incluye una cuarta muteína o polipéptido específico para pioquelina o composición de ésta. En algunas realizaciones, el kit incluye además integrado en él o como uno o más documentos separados, información respecto a los contenidos o el kit y el uso de las muteínas o polipéptidos de éstas. El kit puede incluir en algunas realizaciones una o más composiciones que están formuladas para
25 reconstitución en un diluyente. Dicho diluyente, por ejemplo, un diluyente estéril, también puede estar incluido en el kit, por ejemplo en un contenedor.

f) Muteínas de hNGAL y variantes y fragmentos de éstas

30 La secuencia de aminoácidos de una muteína según la descripción tiene una alta identidad de secuencia con la lipocalina 2 humana cuando se comparan con identidades de secuencia con otra lipocalina (véase también anteriormente). En este contexto general, la secuencia de aminoácidos de una muteína de la combinación según la descripción es al menos sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos de la lipocalina correspondiente (la
35 hNGAL de tipo salvaje). Una secuencia respectiva de una muteína de la combinación según la descripción, siendo sustancialmente similar a la secuencia de hNGAL madura, tal como al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 82%, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90% de identidad, incluyendo al menos 95% de identidad a la secuencia

de hNGAL madura. A este respecto, una muteína de la descripción puede contener por supuesto, en comparación sustituciones como se describe en la presente memoria que convierten a la muteína en capaz de unirse a pioverdina tipo I, II, III o pioquelina, respectivamente. Típicamente, una muteína de hNGAL incluye una o más mutaciones –
5 respecto a la secuencia nativa de hNGAL – de aminoácidos en los cuatro bucles en el extremo abierto del sitio de unión a ligando de hNGAL. Como se ha explicado anteriormente, estas regiones son esenciales para determinar la especificidad de unión de una muteína para pioverdina tipo I, II, III o pioquelina. Una muteína derivada de hNGAL o un homólogo de ésta, puede tener uno, dos, tres, cuatro o más residuos de aminoácidos mutados en cualquier
10 posición de secuencia en la región N-terminal y/o en los tres bucles peptídicos BC, DE, y FG organizados en el extremo de la estructura en barril β que está localizada de forma opuesta al bolsillo de unión natural.

Una muteína según la descripción incluye una o más, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis,
15 siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve o incluso veinte sustituciones en comparación con la hNGAL nativa correspondiente, siempre que dicha muteína sea capaz de unirse a pioverdina o pioquelina, respectivamente. Por ejemplo, una muteína puede tener una sustitución en una posición correspondiente a una posición distinta (es decir, en una posición correspondiente) de hNGAL.
20 En algunas realizaciones, una muteína de la combinación según la descripción incluye al menos dos sustituciones de aminoácidos, incluyendo 2, 3, 4, 5, o incluso más, sustituciones de aminoácidos de un aminoácido nativo por un residuo de arginina. De acuerdo con esto, el ácido nucleico de un soporte proteico de ‘referencia’ como se describe en la presente memoria se somete a mutagénesis con el objetivo de generar una muteína que es capaz de unirse a
25 pioverdina tipo I, II, III o pioquelina, respectivamente.

También, una muteína descrita en la presente memoria puede comprender una secuencia de aminoácidos heteróloga en su extremo N o C, en particular en su extremo C, tal como una Strep-tag®, por ejemplo, Strep-tag® II sin afectar la actividad biológica (unión a su diana, por ejemplo, pioverdina o pioquelina, respectivamente) de la muteína.

30 Específicamente, con el fin de determinar si un residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de una muteína diferente de hNGAL de tipo salvaje corresponde a una determinada posición en la secuencia de aminoácidos de hNGAL de tipo salvaje, un experto en la técnica puede usar medios y métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo,
35 alineamientos, bien manualmente o usando programas informáticos tales como BLAST2.0, que representa Basic Local Alignment Search Tool o ClustalW o cualquier otro programa adecuado que es adecuado para generar alineamientos de secuencias. De acuerdo con esto, hNGAL de tipo salvaje puede servir como “secuencia objeto” o “secuencia de referencia”, mientras la

secuencia de aminoácidos de una muteína diferente de la hNGAL de tipo salvaje descrita en la presente memoria sirve como "secuencia de búsqueda". Los términos "secuencia de referencia" y "secuencia de tipo salvaje" se usan indistintamente en la presente memoria.

- 5 En algunas realizaciones, una sustitución (o reemplazo) es una sustitución conservativa. No obstante, se considera cualquier sustitución - incluyendo sustitución no conservativa o una o más de las sustituciones ejemplares listadas a continuación - siempre que la muteína retenga su capacidad de unirse a pioverdina tipo I, II, III o pioquelina, respectivamente, y/o tenga una identidad con la secuencia entonces sustituida en que es al menos 60%, tal como al menos
10 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85% o una identidad mayor con la secuencia "original".

Las sustituciones conservativas son generalmente las sustituciones siguientes, listadas según el aminoácido que se va a mutar, cada una seguida de uno o más reemplazos que pueden
15 tomarse como conservativos: Ala → Gly, Ser, Val; Arg → Lys; Asn → Gln, His; Asp → Glu; Cys → Ser; Gln → Asn; Glu → Asp; Gly → Ala; His → Arg, Asn, Gln; Ile → Leu, Val; Leu → Ile, Val; Lys → Arg, Gln, Glu; Met → Leu, Tyr, Ile; Phe → Met, Leu, Tyr; Ser → Thr; Thr → Ser; Trp → Tyr; Tyr → Trp, Phe; Val → Ile, Leu. También son permisibles otras sustituciones y pueden determinarse empíricamente o según otras sustituciones conservativas o no conservativas
20 conocidas. Como una orientación adicional, cada uno de los ocho grupos siguientes contiene aminoácidos que pueden tomarse típicamente para definir sustituciones conservativas entre sí:

- a. Alanina (Ala), Glicina (Gly);
- b. Ácido aspártico (Asp), Ácido glutámico (Glu);
- c. Asparagina (Asn), Glutamina (Gln);
- 25 d. Arginina (Arg), Lisina (Lys);
- e. Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Metionina (Met), Valina (Val);
- f. Fenilalanina (Phe), Tirosina (Tyr), Triptófano (Trp);
- g. Serina (Ser), Treonina (Thr); y
- h. Cisteína (Cys), Metionina (Met)

30 Si dichas sustituciones resultan en un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, tales como los siguientes, o como se describe más adelante adicionalmente en referencia a las clases de aminoácidos, y los productos se pueden cribar para una característica deseada. Los ejemplos de dichos cambios más sustanciales son:
35 Ala → Leu, Ile; Arg → Gln; Asn → Asp, Lys, Arg, His; Asp → Asn; Cys → Ala; Gln → Glu; Glu → Gln; His → Lys; Ile → Met, Ala, Phe; Leu → Ala, Met, Norleucina; Lys → Asn; Met → Phe; Phe → Val, Ile, Ala; Trp → Phe; Tyr → Thr, Ser; Val → Met, Phe, Ala.

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas de hNGAL se consiguen seleccionando sustituciones que se diferencien significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura del núcleo polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en hoja o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el tamaño de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos sobre la base de propiedades comunes de las cadenas laterales: (1) hidrofóbico: norleucina, metionina, alanina, valina, leucina, iso-leucina; (2) hidrofílico neutro: cisteína, serina, treonina; (3) ácido: ácido aspártico, ácido glutámico; (4) básico: asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina; (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: glicina, prolina; y (6) aromático: triptófano, tirosina, fenilalanina.

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada de hNGAL también puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir entrecruzamiento aberrante. A la inversa, pueden añadirse enlaces de cisteína para mejorar su estabilidad.

Cualquier mutación, incluyendo una inserción como se ha discutido anteriormente, puede conseguirse muy fácilmente a nivel de ácido nucleico, por ejemplo, ADN usando métodos estándar establecidos. Los ejemplos ilustrativos de alteraciones de la secuencia de aminoácidos son inserciones o deleciones así como sustituciones de aminoácidos. Dichas sustituciones pueden ser conservativas, es decir, un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido de propiedades químicas similares, en particular respecto a la polaridad así como el tamaño. Los ejemplos de sustituciones conservativas son los reemplazos entre los miembros de los grupos siguientes: 1) alanina, serina, y treonina; 2) ácido aspártico y ácido glutámico; 3) asparagina y glutamina; 4) arginina y lisina; 5) iso-leucina, leucina, metionina, y valina; y 6) fenilalanina, tirosina, y triptófano. Por otra parte, también es posible introducir alteraciones no conservativas en la secuencia de aminoácidos. Además, en lugar de reemplazar residuos únicos de aminoácidos, también es posible insertar o deleccionar uno o más aminoácidos continuos de la estructura primaria de hNGAL siempre que estas deleciones o inserción resulten en una muteína plegada/funcional estable.

Las modificaciones de la secuencia de aminoácidos incluyen mutagénesis dirigida de posiciones simples de aminoácidos con el fin de simplificar la sub-clonación del gen de hNGAL mutado o sus partes incorporando sitios de escisión para determinadas enzimas de restricción. Además, estas mutaciones también pueden incorporarse para mejorar adicionalmente la afinidad de una muteína para una diana dada tal como pioverdina o pioquelina. Además, las mutaciones pueden introducirse con el fin de modular determinadas características de la

muteína tales como para mejorar la estabilidad de plegamiento, estabilidad en suero, resistencia a proteínas o solubilidad en agua o para reducir la tendencia a la agregación, si es necesario. Por ejemplo, los residuos de cisteína naturales pueden mutarse a otros aminoácidos para prevenir la formación de puentes disulfuro. También es posible mutar deliberadamente
5 otra posición de la secuencia de aminoácidos a cisteína con el fin de introducir nuevos grupos reactivos, por ejemplo para la conjugación con otros compuestos, tales como polietilén glicol (PEG), hidroxietil almidón (HES), biotina, péptidos o proteínas, o para la formación de uniones disulfuro no naturales. El resto tiol generado puede usarse para PEGilar o HESilar la muteína, por ejemplo, con el fin de incrementar la vida media en suero de una muteína respectiva.

10 También es posible mutar otras posiciones de la secuencia de aminoácidos a cisteína con el fin de introducir nuevos grupos reactivos, por ejemplo, para la conjugación con otros compuestos, tales como polietilén glicol (PEG), hidroxietil almidón (HES), biotina, péptidos o proteínas, o para la formación de uniones disulfuro no naturales.

15 En algunas realizaciones, si se conjuga uno de los restos anteriores con una muteína de la descripción, la conjugación con la cadena lateral de un aminoácido puede ser ventajosa. Las cadenas laterales de aminoácidos adecuadas pueden ser naturales en la secuencia de aminoácidos de hNGAL o pueden introducirse por mutagénesis. En el caso de que se
20 introduzca un sitio de unión adecuado mediante mutagénesis, una posibilidad es el reemplazo de un aminoácido en la posición apropiada por un residuo de cisteína.

Respecto a una muteína de lipocalina 2 humana, las posibilidades ejemplares de dicha mutación para introducir un residuo de cisteína en la secuencia de aminoácidos de una
25 lipocalina incluyendo muteína de lipocalina 2 humana para incluir la introducción de un residuo de cisteína (Cys) al menos en una de las posiciones de secuencia que corresponden a las posiciones de secuencia 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 ó 158 de la secuencia de tipo salvaje de NGAL humana. En algunas realizaciones en las que una muteína de lipocalina 2 humana de la descripción tiene una secuencia en la que, en comparación con la secuencia del
30 Número de Acceso del Banco de Datos SWISS-PROT/UniProt P80188, una cisteína se ha reemplazado por otro residuo de aminoácido, la cisteína correspondiente puede reintroducirse en la secuencia. Como un ejemplo ilustrativo, un residuo de cisteína en la posición de aminoácido 87 puede introducirse en dicho caso revirtiendo a una cisteína como está presente originalmente en la secuencia de SWISS-PROT No de acceso P80188. El resto tiol generado al
35 lado de cualquiera de las posiciones de aminoácido 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 y/o 158 puede usarse para PEGilar o HESilar la muteína, por ejemplo, con el fin de incrementar la vida media en suero de una muteína de lipocalina 2 humana respectiva.

En otra realización, con el fin de proporcionar cadenas laterales de aminoácidos adecuadas para conjugar uno de los compuestos anteriores con una muteína según la presente descripción, pueden introducirse aminoácidos artificiales por mutagénesis. Generalmente, dichos aminoácidos artificiales se diseñan para ser más reactivos y así para facilitar la conjugación con el compuesto deseado. Un ejemplo de dicho aminoácido artificial que puede introducirse mediante un ARNt artificial es para-acetil-fenilalanina.

Para varias aplicaciones de las muteínas descritas en la presente memoria, puede ser ventajoso usarlas en la forma de proteínas de fusión. En algunas realizaciones, una muteína de la descripción se fusiona en su extremo N o su extremo C a una proteína, un dominio de proteína o un péptido, por ejemplo, una secuencia señal y/o una etiqueta de afinidad, como se describe en la presente memoria en conexión con las moléculas de fusión de la invención. Una muteína de la descripción también puede conjugarse con un resto que prolonga la vida media en suero de la muteína, como se describe en la presente memoria en conexión con las moléculas de fusión de la invención. Una muteína de la descripción también puede conjugarse/fusionarse con un agente farmacéuticamente activo, como se describe en la presente memoria en conexión con las moléculas de fusión de la invención.

En general, todos los marcajes usados comúnmente para anticuerpos (excepto aquellos usados exclusivamente con el resto de azúcar en la parte Fc de inmunoglobulinas) también pueden usarse para conjugación con las muteínas de la descripción. Las muteínas de la descripción también pueden conjugarse con cualquier agente terapéuticamente activo adecuado, por ejemplo, para la administración dirigida de dichos agentes a una célula, tejido u órgano dado o para el direccionamiento selectivo a células, por ejemplo, células tumorales sin afectar a las células normales circundantes. Los ejemplos de dichos agentes terapéuticamente activos incluyen radionúclidos, toxinas, moléculas orgánicas pequeñas, y péptidos terapéuticos (tales como péptidos que actúan como agonistas/antagonistas de un receptor de la superficie celular o péptidos que compiten para un sitio de unión de una proteína en una diana celular dada). Las muteínas de la descripción, sin embargo, también pueden conjugarse con ácidos nucleicos terapéuticamente activos tales como moléculas de ácido nucleico antisentido, ARN de interferencia pequeños, micro ARN o ribozimas. Dichos conjugados pueden producirse por métodos muy conocidos en la técnica.

Además, una muteína descrita en la presente memoria puede fusionarse a un resto puede conferir nuevas características a las muteínas de la descripción tal como actividad enzimática o afinidad de unión para otras moléculas. Los ejemplos de parejas de fusión adecuadas son fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, glutatión-S-transferasa, el dominio de unión a

albúmina de la proteína G, proteína A, fragmentos de anticuerpo, dominios de oligomerización o toxinas.

En particular, puede ser posible fusionar una muteína descrita en la presente memoria con un sitio activo de enzima separado de manera que ambos "componentes" de la proteína de fusión resultante actúan conjuntamente en una diana terapéutica dada. El dominio de unión de la muteína se une a la diana causante de la enfermedad, permitiendo que el dominio de la enzima suprima la función biológica de la diana.

En una realización de la descripción, el método incluye someter a la molécula de ácido nucleico a mutagénesis en tripletes de nucleótidos que codifican al menos una, o incluso más, de las posiciones de secuencia correspondientes a las posiciones de secuencia 28, 34, 36, 39-42, 44-47, 49, 52, 54-55, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134, 141 y 145 de la secuencia polipeptídica lineal de NGAL humana (SEQ ID NO: 1).

La descripción también incluye moléculas de ácido nucleico que codifican las muteínas de la descripción, que incluyen mutaciones adicionales fuera de las posiciones de secuencia indicadas de la mutagénesis experimental. Dichas mutaciones se toleran frecuentemente o incluso puede probarse que son ventajosas, por ejemplo si contribuyen a una eficacia de plegamiento, estabilidad en suero, estabilidad térmica o afinidad de unión al ligando mejoradas de las muteínas.

El término "fragmento" tal y como se usa en la presente memoria en conexión con las muteínas de la descripción se refiere a proteínas o péptidos derivados de lipocalina 2 humana madura de longitud completa que están acortados en el extremo N-terminal y/o C-terminal, es decir, carecen de al menos uno de los aminoácidos N-terminales y/o C-terminales. Dichos fragmentos pueden incluir al menos 10, más tal como 20 ó 30 o más aminoácidos consecutivos de la secuencia primaria de la lipocalina 2 humana madura y son habitualmente detectables en un inmunoensayo de la lipocalina 2 humana madura. En general, el término "fragmento", tal y como se usa en la presente memoria respecto al ligando proteico correspondiente de una muteína de la descripción o de la combinación según la descripción o de una proteína de fusión descrita en la presente memoria, se refiere a ligandos proteicos o peptídicos acortados en el extremo N-terminal y/o C-terminal, que retienen la capacidad del ligando de longitud completa de ser reconocido y/o unido por una muteína según la descripción.

El término "mutagénesis" tal y como se usa en la presente memoria significa que las condiciones experimentales se eligen de manera tal que el aminoácido natural en una posición de secuencia dada de la lipocalina 2 humana madura puede sustituirse por al menos un

aminoácido que no está presente en esa posición específica en la secuencia polipeptídica natural respectiva. El término "mutagénesis" también incluye la modificación (adicional) de la longitud de segmentos de secuencia por delección o inserción de uno o más aminoácidos. Así, está en el alcance de la descripción que, por ejemplo, un aminoácido en una posición de secuencia elegida se reemplaza por una cadena de tres mutaciones aleatorias, dando lugar a una inserción de dos residuos de aminoácidos comparado con la longitud del segmento respectivo de la proteína de tipo salvaje. Dicha inserción o delección puede introducirse independientemente una de otra en cualesquiera de los segmentos peptídicos que pueden someterse a mutagénesis en la descripción.

El término "mutagénesis aleatoria" significa que no está presente ningún aminoácido único predeterminado (mutación) en una determinada posición de secuencia pero que al menos dos aminoácidos pueden incorporarse con una determinada probabilidad en una posición de secuencia predefinida durante la mutagénesis.

"Identidad" es una propiedad de las secuencias que mide su similitud o relación. El término "identidad de secuencia" o "identidad" tal y como se usa en la presente descripción significa el porcentaje de residuos idénticos por parejas - después de alineamiento (homólogo) de una secuencia de un polipéptido de la descripción con una secuencia en cuestión - respecto al número de residuos en la más larga de estas dos secuencias. La identidad de secuencia se mide dividiendo el número de residuos de aminoácidos idénticos por el número total de residuos y multiplicando el producto por 100.

El término "homología" se usa en la presente memoria en su significado habitual e incluye aminoácidos idénticos así como aminoácidos que se considera que son sustituciones conservativas (por ejemplo, intercambio de un residuo glutamato por un residuo aspartato) en posiciones equivalentes en la secuencia de aminoácidos lineal de un polipéptido de la descripción (por ejemplo, cualquier mutación de la descripción).

El porcentaje de homología de secuencia o identidad de secuencia puede determinarse en la presente memoria usando, por ejemplo, el programa BLASTP, versión blastp 2.2.5 (16 de noviembre, 2002; véase, Altschul, S. F. et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402). En esta realización, el porcentaje de homología se basa en el alineamiento de las secuencias de polipéptido completas (matriz: BLOSUM 62; costes de hueco: 11,1; valor de corte ajustado a 10^{-3}) incluyendo las secuencias de propéptido, usando preferiblemente el soporte proteico de tipo salvaje como referencia en una comparación por parejas. Se calcula como el porcentaje de números de "positivos" (aminoácidos homólogos) indicado como resultado en el resultado del

programa BLASTP dividido por el número total de aminoácidos seleccionados por el programa para el alineamiento.

Específicamente, con el fin de determinar si un residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de una muteína diferente de la lipocalina 2 humana de tipo salvaje corresponde a una determinada posición en la secuencia de aminoácidos de la lipocalina 2 humana de tipo salvaje, un experto en la técnica puede usar medios y métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, alineamientos, bien manualmente o usando programas informáticos tales como BLAST2.20, que representa Basic Local Alignment Search Tool o ClustalW o cualquier otro programa adecuado que es adecuado para generar alineamientos de secuencias. De acuerdo con esto, la lipocalina 2 humana de tipo salvaje puede servir como “secuencia objeto” o “secuencia de referencia”, mientras la secuencia de aminoácidos de una muteína diferente de la lipocalina 2 humana de tipo salvaje descrita en la presente memoria sirve como “secuencia de búsqueda”. Los términos “secuencia de referencia” y “secuencia de tipo salvaje” se usan indistintamente en la presente memoria.

"Huecos" son espacios en un alineamiento que son el resultado de adiciones o deleciones de aminoácidos. Así, dos copias de exactamente la misma secuencia tienen 100% de identidad, pero las secuencias que están menos altamente conservadas, y tienen deleciones, adiciones, o reemplazos, pueden tener un grado menor de identidad de secuencia. Los expertos en la técnica reconocerán que varios programas informáticos están disponibles para determinar la identidad de secuencia usando parámetros estándar, por ejemplo Blast (Altschul, et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402), Blast2 (Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410), y Smith-Waterman (Smith, et al. (1981) J. Mol. Biol. 147, 195-197).

El término “variante” tal y como se usa en la presente descripción se refiere a derivados de una proteína o péptido que incluyen modificaciones de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, por sustitución, deleción inserción o modificación química. Dichas modificaciones no reducen, en algunas realizaciones, la funcionalidad de la proteína o péptido. Dichas variantes incluyen proteínas, en las que uno o más aminoácidos se han reemplazado por sus D-estereoisómeros respectivos o por aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos naturales, tales como, por ejemplo, ornitina, hidroxiprolina, citrulina, homoserina, hidroxilisina, norvalina. Sin embargo, dichas sustituciones también pueden ser conservativas, es decir, un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido químicamente similar. Los ejemplos de sustituciones conservativas son los reemplazos entre los miembros de los grupos siguientes: 1) alanina, serina, y treonina; 2) ácido aspártico y ácido glutámico; 3) asparagina y glutamina; 4) arginina y lisina; 5) isoleucina, leucina, metionina, y valina; y 6) fenilalanina, tirosina, y triptófano.

Por una lipocalina 2 humana de "secuencia nativa" se quiere decir lipocalina 2 humana que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido correspondiente derivado de la naturaleza. Así, una lipocalina 2 humana de secuencia nativa puede tener una secuencia de aminoácidos de la lipocalina 2 humana natural respectiva. Dicho polipéptido de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes o sintéticos. El término polipéptido de "secuencia nativa" engloba específicamente formas naturales truncadas o secretadas de la lipocalina 2 humana, formas naturales variantes tales como formas de corte y empalme alternativo y variantes naturales alélicas de lipocalina 2 humana. Una "variante" de polipéptido significa un polipéptido biológicamente activo que tiene al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80% o al menos aproximadamente 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que uno o más residuos de aminoácidos se añaden o delecionan en el extremo N o C del polipéptido. Generalmente, una variante tiene al menos aproximadamente 70%, incluyendo al menos aproximadamente 80%, tal como al menos aproximadamente 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos, incluyendo al menos aproximadamente 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos o al menos aproximadamente 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa.

El término "posición" cuando se usa según la descripción, significa la posición bien de un aminoácido en una secuencia de aminoácidos representada en la presente memoria o la posición de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico representada en la presente memoria. Para entender el término "corresponde" o "correspondiente" tal y como se usa en la presente memoria en el contexto de las posiciones de secuencia de aminoácidos de una o más muteínas, una posición correspondiente no sólo se determina por el número de nucleótidos/aminoácidos precedentes. De acuerdo con esto, la posición de un aminoácido dado según la descripción que puede sustituirse puede variar debido a la delección o adición de aminoácidos en otro lugar en una lipocalina 2 humana (mutante o de tipo salvaje). De manera similar, la posición de un nucleótido dado según la presente descripción que puede sustituirse puede variar debido a delecciones o nucleótidos adicionales en otro lugar en la región no traducida 5' (UTR) de una muteína o de lipocalina 2 humana de tipo salvaje incluyendo el promotor y/o cualesquiera otras secuencias reguladoras o gen (incluyendo exones e intrones).

Así, para una posición correspondiente según la descripción, es preferible entender que las posiciones de nucleótidos/aminoácidos pueden diferenciarse en el número indicado que nucleótidos/aminoácidos similares vecinos, pero dichos nucleótidos/aminoácidos vecinos, que pueden intercambiarse, deleccionarse o añadirse, también están comprendidos por la una o más posiciones correspondientes.

Además, para una posición correspondiente en una muteína sobre la base de un soporte de referencia según la descripción, es preferible entender que las posiciones de nucleótidos/aminoácidos son estructuralmente correspondientes a las posiciones en otro lugar en una muteína o lipocalina 2 humana de tipo salvaje, incluso si pueden diferenciarse en el número indicado.

g) Realizaciones específicas respecto a muteínas de hNGAL y polipéptidos que las comprenden, por ejemplo, para uso en las moléculas de fusión de la presente invención

1. Un polipéptido que tiene especificidad de unión para pioverdina tipo I, II, III o pioquelina, en el que el polipéptido comprende una muteína de hNGAL que se une a pioverdina tipo I, II, III o pioquelina, por ejemplo, con afinidad detectable.

2. El polipéptido de la realización 1, en el que la muteína de hNGAL comprende un residuo de aminoácido mutado en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 28, 34, 36, 39-42, 44-47, 49, 52, 54-55, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134, 141 y 145 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (SEQ ID NO: 1).

3. El polipéptido de la realización 1, en el que dicha muteína es capaz de unirse a pioverdina tipo I en complejo con hierro con una K_D de aproximadamente 20 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide con un instrumento Biacore T200 en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 6.

4. El polipéptido de la realización 1, en el que dicha muteína de hNGAL es capaz de unirse a Pvd tipo I succinilo, Pvd tipo I succinamida y Pvd tipo I α -cetoglutarilo con y sin hierro en complejo, con una afinidad medida por un valor CI_{50} de aproximadamente 200 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo ELISA esencialmente descrito en el Ejemplo 5.

5. El polipéptido de la realización 3, en el que la muteína de hNGAL es capaz de inhibir la captación de hierro mediada por pioverdina tipo I con un valor CI_{50} de aproximadamente 150 nM o menor en un formato ELISA de competición esencialmente descrito en el Ejemplo 7.

6. El polipéptido de la realización 3, en el que la muteína de hNGAL es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de una cepa Pvd I en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 8.

7. El polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores 3 a 6, en el que la muteína de hNGAL comprende un residuo de aminoácido mutado en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 28, 36, 39-41, 46, 49, 52, 54-55, 59, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132, 134 y 136 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (SEQ ID NO: 1).

8. El polipéptido de una cualquiera de las realizaciones 3-7, en el que la secuencia de aminoácidos de la muteína de hNGAL comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos mutados siguientes en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura: Leu 36 → Asn, Thr, Val, Trp o Phe; Ala 40 → Gly, Asn, Thr o Phe; Ile 41 → Arg, Ala, Thr, Phe o Trp; Gln 49 → Ile, Leu, Val, Ala o Pro; Tyr 52 → Met, Trp o Pro; Ser 68 → Asp, Val o Glu; Leu 70 → Gln, Trp, Asp o Thr; Arg 72 → Trp, Ala, Ser, Leu, Pro o Glu; Lys 73 → Asp, Leu, Ala, Glu o Asn; Asp 77 → Arg, Leu, Tyr, Ser, Gln, Thr, Ile o Asn; Trp 79 → Gln, Asp, Ser, Arg, Met o Glu; Arg 81 → Gln, Gly, Ile, Glu, His o Asp; Asn 96 → His, Ile, Gly, Tyr o Asp; Tyr 100 → Lys, Glu, Asn, Ser, Phe o Tyr; Leu 103 → Lys, Pro, Gln, His, Asp, Tyr, Glu, Trp o Asn; Tyr 106 → His, Gln o Phe; Lys 125 → Arg, Ser, Trp, Tyr, Val o Gly; Ser 127 → Trp, Asn, Ala, Thr, Tyr, His, Ile, Val o Asp; Tyr 132 → Trp, Asn, Gly o Lys; y Lys 134 → Asn, His, Trp, Gly, Gln o Asp.

9. El polipéptido de una cualquiera de las realizaciones 3-8, en el que la secuencia de aminoácidos de la muteína de hNGAL comprende la sustitución siguiente en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura: Gln 28 → His; Lys 46 → Glu; Thr 54 → Val o Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Asn 65 → Asp o Gln; Ile 80 → Thr; Cys 87 → Ser o Asn; y Thr 136 → Ala.

10. El polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores 3-8, en el que la muteína de hNGAL comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ó 21 residuos de aminoácidos mutados en las posiciones de secuencia 28, 36, 39-41, 46, 49, 52, 54-55, 59, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132, 134 y 136 de la secuencia polipeptídica lineal de la NGAL humana madura (SEQ ID NO: 1).

11. El polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores 3-10, en el que la muteína de hNGAL comprende uno de los conjuntos siguientes de sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura:

(a) Gln 28 → His; Leu 36 → Asn; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Val; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Gln; Arg 81 → Gln; Cys 87 → Ser; Asn 96 → His; Tyr 100 → Lys; Leu 103 → His; Tyr 106 → His; Lys 125 → Arg; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Asp;

(b) Gln 28 → His; Leu 36 → Thr; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Phe; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Trp; Leu 70 → Trp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Tyr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Gly; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ile; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → His; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Asn; Tyr 132 → Asn; Lys 134 → Gln;

(c) Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Lys; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Ala; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;

- (d) Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Tyr; Tyr 100 → Lys; Leu 103 → Pro; Tyr 106 → Phe; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → Gly;
- 5 (e) Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His;
- 10 (f) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Phe; Ile 41 → Phe; Gln 49 → Ala; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Trp; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Glu; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Tyr; Leu 103 → Tyr; Tyr 106 → His; Lys 125 → Val; Ser 127 → His; Tyr 132 → Lys; Lys 134 → Trp;
- 15 (g) Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- 20 (h) Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Asp; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- 25 (i) Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Glu; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Asp; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- 30 (j) Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Val; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Asn; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;
- (k) Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His;
- 35 (l) Gln 28 → His; Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 → Val; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn;

- (m) Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Lys 46 → Glu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Thr 54 → Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Glu; Ser 87 → Asn; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His;
- (n) Leu 36 → Trp; Asn 39 → Asp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 → Val; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn; Thr 136 → Ala;
- (o) Leu 36 → Trp; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Pro; Thr 54 → Val; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Gln; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Ser; Trp 79 → Ser; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → His; Lys 125 → Tyr; Ser 127 → Thr; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Asn; Thr 136 → Ala;
- (p) Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Lys 46 → Glu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Thr 54 → Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Glu; Ser 87 → Asn; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His; o
- (q) Gln 28 → His; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Trp; Lys 46 → Glu; Gln 49 → Leu; Tyr 52 → Met; Thr 54 → Ala; Ile 55 → Val; Lys 59 → Arg; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Val; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Glu; Lys 73 → Leu; Lys 74 → Glu; Lys 75 → Glu; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Met; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Glu; Ser 87 → Asn; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Tyr; Tyr 132 → Trp; Lys 134 → His.
12. El polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 3-11, en el que la muteína de hNGAL comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2-18 o un fragmento o variante de éstas.
13. El polipéptido de la realización 1, en el que dicha muteína de hNGAL es capaz de unirse a pioverdina tipo II en complejo con hierro con una K_D de aproximadamente 20 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide con un instrumento Biacore T200 en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 6.
14. El polipéptido de la realización 1, en el que dicha muteína de hNGAL es capaz de unirse a Pvd tipo II succinilo, Pvd tipo II succinamida y Pvd tipo II α -cetoglutarilo con y sin hierro en complejo, con una afinidad medida por un valor CI_{50} de aproximadamente 200 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo ELISA esencialmente descrito en el Ejemplo 5.

15. El polipéptido de la realización 13, en el que la muteína de hNGAL es capaz de inhibir la captación de hierro mediada por pioverdina tipo II con un valor CI_{50} de aproximadamente 150 nM o menor en un formato ELISA de competición esencialmente descrito en el Ejemplo 7.
16. El polipéptido de la realización 13, en el que la muteína de hNGAL es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de una cepa Pvd II en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 8.
17. El polipéptido de la realización 13, en el que dicha muteína de hNGAL es capaz de inhibir el crecimiento de cepas de *P. aeruginosa* que expresan pioverdina tipo II en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 9.
18. El polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores 13 a 17, en el que la muteína de hNGAL comprende un residuo de aminoácido mutado en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 28, 36, 40-41, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 y 134 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (SEQ ID NO: 1).
19. El polipéptido de una cualquiera de las realizaciones 13-18, en el que la secuencia de aminoácidos de la muteína de hNGAL comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos mutados siguientes en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura: Leu 36 → Asn, Ile o Val; Ala 40 → Glu, Gly, Asn, Thr o His; Ile 41 → Arg, Val o Thr; Gln 49 → Gly, Ala o Pro; Tyr 52 → Asn, Gly, Trp o Pro; Ser 68 → Asp, Arg o Glu; Leu 70 → Arg o Trp; Arg 72 → His, Ile, Ala, Ser o Gly; Lys 73 → Asn, Met, Pro, Phe, Gln o Arg; Asp 77 → His, Ile, Met, Lys, Gly o Asn; Trp 79 → Ser, Tyr, Ala, Asp, Phe o Trp; Arg 81 → Glu, Ser, Tyr o Asp; Asn 96 → Met, Ile, Arg, Asp, Lys, Asn o Ala; Tyr 100 → Lys, Glu, Asn, Ser, Phe o Tyr; Leu 103 → Thr, Ile, Gln, Gly, Met, His, Trp o Val; Tyr 106 → Met, Gln, Ala, Ile, Asn, Gly, Met o Phe; Lys 125 → Ala, Ile o Asn; Ser 127 → Lys, Arg, Ser, Met, Asp o Asn; Tyr 132 → Met, Phe, Asn, Ala, Ile, Gly o Val; y Lys 134 → Trp o Tyr.
20. El polipéptido de una cualquiera de las realizaciones 13-19, en el que la secuencia de aminoácidos de la muteína de hNGAL comprende la sustitución siguiente en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura: Gln 28 → His; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Asp o Gln y Cys 87 → Ser.
21. El polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores 13-20, en el que la muteína de hNGAL comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ó 21 residuos de aminoácidos mutados en las posiciones de secuencia 28, 36, 40-41, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72-75, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 y 134 de la secuencia polipeptídica lineal de la NGAL humana madura (SEQ ID NO: 1).
22. El polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores 13-21, en el que la muteína de hNGAL comprende uno de los conjuntos siguientes de sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL natural de tipo salvaje:

- (a) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Glu; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Met; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- 5 (b) Gln 28 → His; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Met; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ile; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Met; Lys 134 → Trp;
- 10 (c) Gln 28 → His; Leu 36 → Ile; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Met; Tyr 100 → Ser; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Ala; Lys 125 → Lys; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Trp;
- 15 (d) Gln 28 → His; Ala 40 → Asn; Gln 49 → Ala; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ser; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Met; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Tyr; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Ile; Lys 125 → Lys; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;
- 20 (e) Gln 28 → His; Ala 40 → His; Gln 49 → Ala; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Trp; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Phe; Lys 125 → Ala; Ser 127 → Asp; Tyr 132 → Asn; Lys 134 → Trp;
- 25 (f) Gln 28 → His; Leu 36 → Asn; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Arg; Leu 70 → Trp; Arg 72 → Asn; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Asp; Tyr 100 → Thr; Leu 103 → Trp; Tyr 106 → Asn; Lys 125 → Asn; Ser 127 → Met; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Tyr;
- 30 (g) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Gly; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Gly; Trp 79 → Trp; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Trp; Leu 103 → Ile; Tyr 106 → Gly; Lys 125 → Lys; Ser 127 → Asn; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Trp;
- 35 (h) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Glu; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Val; Tyr 106 → Met; Lys 125 → Asn; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- (i) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Met; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Val; Lys 134 → Trp;
- (j) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Phe; Arg 81 → Glu; Cys

- 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Met; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Trp;
- (k) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Gly; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Trp; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → His; Tyr 106 → Met; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- (l) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Phe; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp;
- (m) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp;
- (n) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Glu; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Phe; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Val; Tyr 106 → Met; Lys 125 → Asn; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- (o) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Glu; Ile 41 → Val; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Pro; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Arg 72 → His; Lys 73 → Asn; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Phe; Arg 81 → Glu; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Val; Tyr 106 → Met; Lys 125 → Asn; Ser 127 → Lys; Tyr 132 → Gly; Lys 134 → Trp;
- (p) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp;
- (q) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp;
- (r) Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp; o
- (s) Leu 36 → Val; Ala 40 → Thr; Ile 41 → Ile; Gln 49 → Gly; Tyr 52 → Asn; Thr 54 → Ala; Asn 65 → Gln; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Ile; Lys 73 → Arg; Asp 77 → His; Trp 79 → Tyr; Arg 81 → Asp; Cys 87 → Ser; Leu 103 → Thr; Tyr 106 → Gln; Lys 125 → Ile; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ile; Lys 134 → Trp.

23. El polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 13 a 22, en el que la muteína de hNGAL comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 19-37 o un fragmento o variante de éstas.
24. El polipéptido de la realización 1, en el que dicha muteína es capaz de unirse a pioverdina tipo III en complejo con hierro con una K_D de aproximadamente 20 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide con un instrumento Biacore T200 en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 6.
25. El polipéptido de la realización 1, en el que dicha muteína de hNGAL es capaz de unirse a Pvd tipo III succinilo, Pvd tipo III succinamida y Pvd tipo III α -cetoglutarilo con y sin hierro en complejo, con una afinidad medida por un valor CI_{50} de aproximadamente 200 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 5.
26. El polipéptido de la realización 24, en el que la muteína de hNGAL es capaz de inhibir la captación de hierro mediada por pioverdina tipo III con un valor CI_{50} de aproximadamente 150 nM o menor en un formato ELISA de competición esencialmente descrito en el Ejemplo 7.
27. El polipéptido de la realización 24, en el que la muteína de hNGAL es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de una cepa Pvd III en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 8.
28. El polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores 24 a 27, en el que la muteína de hNGAL comprende un residuo de aminoácido mutado en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 28, 36, 40-42, 45-47, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105-106, 125, 127, 132, 134 y 145 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (SEQ ID NO: 1).
29. El polipéptido de una cualquiera de las realizaciones 24-28, en el que la secuencia de aminoácidos de la muteína de hNGAL comprende al menos uno de los residuos de aminoácidos mutados siguientes en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura: Leu 36 $\rightarrow$ Phe or Glu; Ala 40 $\rightarrow$ Trp, Leu o Arg; Ile 41 $\rightarrow$ Met, Arg, Ala, Leu o Trp; Gln 49 $\rightarrow$ His, Ile, Arg, Lys, Met o Pro; Tyr 52 $\rightarrow$ Asn, Tyr, Arg, Ser o Met; Ser 68 $\rightarrow$ Asp, Asn, Glu o Gln; Leu 70 $\rightarrow$ Lys, Asn o Arg; Arg 72 $\rightarrow$ Leu, Arg, Gln o Tyr; Lys 73 $\rightarrow$ His, Leu, Ala, Pro, Gln o Tyr; Asp 77 $\rightarrow$ Ala, Ile, Lys, Gln o Arg; Trp 79 $\rightarrow$ Ser o Asp; Arg 81 $\rightarrow$ His, Ala, Ser o Val; Asn 96 $\rightarrow$ Met, Ile, Arg, Gly, Leu o Val; Tyr 100 $\rightarrow$ Ala, Ile, Asn, Pro o Asp; Leu 103 $\rightarrow$ Gln, Gly, Phe o Pro; Tyr 106 $\rightarrow$ Glu; Lys 125 $\rightarrow$ Trp o Thr; Ser 127 $\rightarrow$ Val, His, Ile, Phe o Ala; Tyr 132 $\rightarrow$ Phe; y Lys 134 $\rightarrow$ Trp, Gln o Glu.
30. El polipéptido de una cualquiera de las realizaciones 24-29, en el que la secuencia de aminoácidos de la muteína de hNGAL comprende la sustitución siguiente en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura: Gln 28 $\rightarrow$ His; Leu 42 $\rightarrow$ Arg; Asp 45 $\rightarrow$ Gly; Lys 46 $\rightarrow$ Arg; Asp 47 $\rightarrow$ Asn; Asn 65 $\rightarrow$ Asp; Cys 87 $\rightarrow$ Ser; Ser 105 $\rightarrow$ Pro y Thr 145 $\rightarrow$ Pro.

31. El polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores 24-30, en el que la muteína de hNGAL comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ó 21 residuos de aminoácidos mutados en las posiciones de secuencia 28, 36, 40-42, 45-47, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 105-106, 125, 127, 132, 134 y 145 de la secuencia polipeptídica lineal de la NGAL humana madura (SEQ ID NO: 1).

32. El polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores 24-31, en el que la muteína de hNGAL comprende uno de los conjuntos siguientes de sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura:

(a) Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Trp; Ile 41 → Met; Gln 49 → His; Tyr 52 → Asn; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Gln; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ile; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp; Ser 127 → His; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Gln;

(b) Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Arg; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Tyr; Ser 68 → Gln; Leu 70 → Asn; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Leu; Asp 77 → Ala; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Arg; Tyr 100 → Ile; Leu 103 → Pro; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Thr; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;

(c) Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Leu; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Arg; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Tyr; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ala; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Gly; Tyr 100 → Ala; Leu 103 → Phe; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Ala; Lys 134 → Glu;

(d) Gln 28 → His; Leu 36 → Phe; Ala 40 → Trp; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Pro; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Asn; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Pro; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Ser; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Met; Tyr 100 → Pro; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Glu; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Glu;

(e) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Lys; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Ala; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

(f) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → Gln; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

(g) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Thr; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Val; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

(h) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys

87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

(i) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Gln 49 → Lys; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → Tyr; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → -; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

(j) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Leu 42 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

(k) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp 47 → Asn; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp; Thr 145 → Pro;

(l) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

(m) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Leu 42 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp;

(n) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp 47 → Asn; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp; Thr 145 → Pro;

(o) Gln 28 → His; Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp; o

(p) Leu 36 → Glu; Ala 40 → Leu; Ile 41 → Ala; Leu 42 → Arg; Gln 49 → Met; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Glu; Leu 70 → Arg; Lys 73 → His; Asp 77 → Lys; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Val; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Leu; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → Gln; Ser 105 → Pro; Tyr 106 → Glu; Ser 127 → Val; Tyr 132 → Phe; Lys 134 → Trp.

33. El polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 24 a 32, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 38-53 o un fragmento o variante de éstas.

34. El polipéptido de la realización 1, en el que dicha muteína de hNGAL es capaz de unirse a pioquelina en complejo con hierro con una K_D de aproximadamente 20 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide con un instrumento Biacore T200 en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 6.
- 5 35. El polipéptido de la realización 1, en el que dicha muteína de hNGAL es capaz de unirse a pioquelina en complejo con hierro, con una afinidad medida por un valor CI_{50} de aproximadamente 500 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 5.
36. El polipéptido de la realización 1, en el que dicha muteína de hNGAL es capaz de unirse
10 a pioquelina sin hierro en complejo, con una afinidad medida por un valor CI_{50} de aproximadamente 200 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 5.
37. El polipéptido de la realización 1, en el que dicha muteína de hNGAL es capaz de unirse a pioquelina con y sin hierro en complejo, con una afinidad medida por un valor CI_{50} de
15 aproximadamente 200 nM o menor, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 5.
38. El polipéptido de la realización 34, en el que la muteína de hNGAL es capaz de inhibir la captación de hierro mediada por pioquelina con un valor CI_{50} de aproximadamente 150 nM o menor en un formato ELISA de competición esencialmente descrito en el Ejemplo 7.
- 20 39. El polipéptido de la realización 34, en el que la muteína de hNGAL es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de Pvd I inactivada ($\Delta pvdA$) en un ensayo esencialmente descrito en el Ejemplo 8.
40. El polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores 34 a 39, en el que la muteína de hNGAL comprende un residuo de aminoácido mutado en una o más posiciones
25 correspondientes a las posiciones 28, 34, 36, 40-41, 44-46, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134 y 141 de la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura (SEQ ID NO: 1).
41. El polipéptido de una cualquiera de las realizaciones 34-40, en el que la secuencia de aminoácidos de la muteína de hNGAL comprende al menos uno de los residuos de
30 aminoácidos mutados siguientes en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura: Leu 36 $\rightarrow$ His, Met o Val; Ala 40 $\rightarrow$ Ile, Gln, Tyr o Phe; Ile 41 $\rightarrow$ Leu, His o Trp; Gln 49 $\rightarrow$ His, Arg, Ser o Ala; Tyr 52 $\rightarrow$ Leu, Trp o Pro; Ser 68 $\rightarrow$ Asp o His; Leu 70 $\rightarrow$ Arg o Trp; Arg 72 $\rightarrow$ His, Ile, Ala, Ser o Gly; Lys 73 $\rightarrow$ Asn, Met, Pro, Phe, Gln o Arg; Asp 77 $\rightarrow$ Arg, Thr, Pro o Asp; Trp 79 $\rightarrow$ Ala, Arg, Lys o Asp; Arg 81 $\rightarrow$ Thr, Ile o Trp; Asn 96 $\rightarrow$ Met, Asn, Pro
35 o Ala; Tyr 100 $\rightarrow$ Gly, His o Glu; Leu 103 $\rightarrow$ Gly, Met, His o Gln; Tyr 106 $\rightarrow$ Met, Gly, Arg o Trp; Lys 125 $\rightarrow$ Trp, Phe, Gly o Leu; Ser 127 $\rightarrow$ Arg, Trp, Asp o Ile; Tyr 132 $\rightarrow$ Ala, Glu o Thr; y Lys 134 $\rightarrow$ Leu, Val, Asn o Phe.

42. El polipéptido de una cualquiera de las realizaciones 34-41, en el que la secuencia de aminoácidos de la muteína de hNGAL comprende la sustitución siguiente en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura: Gln 28 → His; Val 34 → Leu; Glu 44 → Gly; Asp 45 → Gly; Lys → Arg o Tyr; Asn 65 → Asp; Ile 80 → Thr; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Val 108 → Ala; Phe 123 → Ser y Thr 141 → Ala.
43. El polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores 34-42, en el que la muteína de hNGAL comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ó 21 residuos de aminoácidos mutados en las posiciones de secuencia 28, 34, 36, 40-41, 44-46, 49, 52, 54, 65, 68, 70, 72-74, 77, 79-81, 87, 96, 100, 103, 106, 108, 123, 125, 127, 132, 134 y 141 de la secuencia polipeptídica lineal de la NGAL humana madura (SEQ ID NO: 1).
44. El polipéptido según cualquiera de las realizaciones anteriores 34-43, en el que la muteína de hNGAL comprende uno de los conjuntos siguientes de sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia polipeptídica lineal de la hNGAL madura:
- (a) Gln 28 → His; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Leu; Ser 68 → His; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Lys; Lys 73 → Trp; Asp 77 → Ile; Trp 79 → Ser; Arg 81 → His; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Met; Tyr 100 → Asn; Leu 103 → His; Tyr 106 → Met; Lys 125 → Trp; Ser 127 → Asp; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Leu;
- (b) Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Asp 77 → His; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe;
- (c) Gln 28 → His; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe; Ile 41 → His; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → His; Leu 70 → Pro; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ala; Trp 79 → Lys; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Trp; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thr; Lys 134 → Val;
- (d) Gln 28 → His; Leu 36 → Val; Ala 40 → Tyr; Ile 41 → Trp; Gln 49 → Ala; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Arg; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Arg; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Pro; Tyr 100 → Glu; Leu 103 → Gln; Tyr 106 → Arg; Lys 125 → Leu; Ser 127 → Arg; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Asn;
- (e) Gln 28 → His; Val 34 → Leu; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe; Ile 41 → His; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → His; Leu 70 → Pro; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ala; Trp 79 → Lys; Ile 80 → Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Trp; Phe 123 → Ser; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thr; Lys 134 → Val; Thr 141 → Ala;
- (f) Gln 28 → His; Leu 36 → Met; Ala 40 → Phe; Ile 41 → His; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Pro; Ser 68 → His; Leu 70 → Pro; Arg 72 → Trp; Lys 73 → Ala; Asp 77 → Ala; Trp 79 → Lys; Ile 80

→ Thr; Arg 81 → Ile; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Ala; Tyr 100 → Gly; Leu 103 → Met; Tyr 106 → Trp; Phe 123 → Ser; Lys 125 → Gly; Ser 127 → Trp; Tyr 132 → Thr; Lys 134 → Val;

(g) Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe;

(h) Gln 28 → His; Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Glu 44 → Gly; Lys 46 → Tyr; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Lys 74 → Glu; Asp 77 → His; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Val 108 → Ala; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe; o

(i) Leu 36 → His; Ala 40 → Gln; Ile 41 → Trp; Asp 45 → Gly; Lys 46 → Arg; Gln 49 → Arg; Tyr 52 → Trp; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Asp; Arg 72 → Ala; Lys 73 → Ile; Asp 77 → Leu; Trp 79 → Arg; Arg 81 → Thr; Cys 87 → Ser; Tyr 100 → His; Leu 103 → Gly; Tyr 106 → Gly; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Ala; Lys 134 → Phe.

45. El polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 34 a 44, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 54-63 o un fragmento o variante de éstas.

46. El polipéptido según la realización 1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2-63 o un fragmento o variante de éstas.

47. El polipéptido de una cualquiera de las realizaciones 1-46, en el que dicha muteína de hNGAL comprende uno o más residuos de cisteína no nativos sustituyendo uno o más aminoácidos de una hNGAL de tipo salvaje.

48. El polipéptido de una cualquiera de las realizaciones 1-46, en el que dicha muteína de hNGAL comprende al menos una sustitución de aminoácidos de un residuo de cisteína nativo por otro aminoácido.

49. El polipéptido de la realización 48, en el que dicho otro aminoácido es un residuo de serina.

50. El polipéptido de una cualquiera de las realizaciones 1-46, en el que la muteína de hNGAL se conjuga con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en una molécula orgánica, un marcaje enzimático, un marcaje radiactivo, un marcaje coloreado, un marcaje fluorescente, un marcaje cromogénico, un marcaje luminiscente, un hapteno, digoxigenina, biotina, un agente citostático, una toxina, un complejo metálico, un metal, y oro coloidal.

51. El polipéptido de una cualquiera de las realizaciones 1-46, en el que la muteína de hNGAL se fusiona en su extremo N y/o su extremo C con una pareja de fusión que es una proteína, o un dominio de proteína o un péptido.

52. El polipéptido de una cualquiera de las realizaciones 1-46, en el que la muteína de hNGAL se conjuga con un compuesto que prolonga la vida media en suero del polipéptido.

53. El polipéptido de la realización 52, en el que el compuesto que prolonga la vida media en suero se selecciona del grupo que consiste en una molécula de polialquilen glicol, hidroxietil almidón, una parte Fc de una inmunoglobulina, un dominio CH3 de una inmunoglobulina, un dominio CH4 de una inmunoglobulina, un péptido de unión a albúmina, y una proteína de unión a albúmina.
54. El polipéptido de la realización 53, en el que el polialquilen glicol es polietileno (PEG) o un derivado activado de éste.
55. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de una cualquiera de las realizaciones 1--54.
56. La molécula de ácido nucleico de la realización 55, en la que la molécula de ácido nucleico está unida de manera operativa a una secuencia reguladora para permitir la expresión de dicha molécula de ácido nucleico.
57. La molécula de ácido nucleico de las realizaciones 55 ó 56, en la que la molécula de ácido nucleico está comprendida en un vector o en un vector fagémido.
58. Una célula huésped que contiene una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las realizaciones 55 a 57.
59. Un método para producir el polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 1-54, en el que el polipéptido se produce empezando a partir del ácido nucleico que codifica el polipéptido mediante métodos de ingeniería genética.
60. El método de la realización 59, en el que el polipéptido se produce en un organismo huésped bacteriano o eucariota y se aísla de este organismo huésped o su cultivo.
61. Una composición que comprende uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en (i) un polipéptido específico para pioverdina tipo I, (ii) un polipéptido específico para pioverdina tipo II, (iii) un polipéptido específico para pioverdina tipo III y (iv) un polipéptido específico para pioquelina.
62. La composición de la realización 61, que comprende dos o más polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en (i) un polipéptido específico para pioverdina tipo I, (ii) un polipéptido específico para pioverdina tipo II, (iii) un polipéptido específico para pioverdina tipo III y (iv) un polipéptido específico para pioquelina.
63. La composición de la realización 62, que comprende tres o cuatro polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en (i) un polipéptido específico para pioverdina tipo I, (ii) un polipéptido específico para pioverdina tipo II, (iii) un polipéptido específico para pioverdina tipo III y (iv) un polipéptido específico para pioquelina.
64. La composición de una cualquiera de las realizaciones 61-63, en la que el polipéptido específico para pioverdina tipo I es un polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 3-11.

65. La composición de una cualquiera de las realizaciones 61-63, en la que el polipéptido específico para pioverdina tipo II es un polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 12-21.
- 5 66. La composición de una cualquiera de las realizaciones 61-63, en la que el polipéptido específico para pioverdina tipo III es un polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 22-30.
67. La composición de una cualquiera de las realizaciones 61-63, en la que el polipéptido específico para pioquelina es un polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 31-41.
- 10 68. La composición de una cualquiera de las realizaciones 61-67, en la que dicha composición incluye además al menos un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
69. Un método para unir pioverdina tipo I, II, III y/o pioquelina en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de la composición de una cualquiera de las realizaciones 61-67.
- 15 70. Un método para inhibir o disminuir el crecimiento de *P. aeruginosa* en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de la composición de una cualquiera de las realizaciones 61-67.
71. Un kit que comprende en uno o más contenedores, separadamente o en mezcla, y la composición de una cualquiera de las realizaciones 61-67.
- 20 72. Uso de (i) un primer polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 3-11, (ii) un segundo polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 12-21, (iii) un tercer polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 22-30 y/o (iv) un cuarto polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 31-41, para la unión de pioverdina tipo I, II, III y/o pioquelina en un sujeto.
- 25 73. Uso de (i) un primer polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 3-12, (ii) un segundo polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 13-23, (iii) un tercer polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 24-33 y/o (iv) un cuarto polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 34-45, para prevenir o reducir la captación de hierro por *P. aeruginosa* a través de pioquelina y/o pioverdina en un sujeto.
- 30 74. Uso de (i) un primer polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 3-12, (ii) un segundo polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 13-23, (iii) un tercer polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 24-33 y/o (iv) un cuarto polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 34-45, para el tratamiento o alivio de infección por biopelícula de *P. aeruginosa* en un sujeto.
- 35 75. El uso de la realización 74, en el que la infección por biopelícula de *P. aeruginosa* es una infección aguda o crónica.

76. El uso de las realizaciones 72-75, en el que dicho primer, segundo, tercer y/o cuarto polipéptidos se administran en combinación, incluyendo concurrentemente, concomitantemente o en serie.

77. El uso de las realizaciones 72-75, en el que dicho primer, segundo, tercer y/o cuarto polipéptidos se administran independientemente uno de otro, incluyendo a intervalos individuales a puntos de tiempo independientes.

78. Una combinación de (i) un polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 3-11, (ii) un polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 12-21, (iii) un polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 22-30 y/o (iv) un polipéptido según una cualquiera de las realizaciones 31-41.

C. Moléculas de ácido nucleico

La presente invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico (ADN o ARN) que incluyen secuencias de nucleótidos que codifican las moléculas de fusión de la invención. Debido a que la degeneración del código genético permite sustituciones de determinados codones por otros codones que especifican el mismo aminoácido, la invención no está limitada a una molécula de ácido nucleico específica que codifica una molécula de fusión como se describe en la presente memoria sino que engloba todas las moléculas de ácido nucleico que incluyen secuencias de nucleótidos que codifican una molécula de fusión funcional.

Una molécula de ácido nucleico descrita en esta solicitud puede estar “unida de forma operativa” a una secuencia reguladora (o secuencias reguladoras) para permitir la expresión de esta molécula de ácido nucleico.

Una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, se refiere como “capaz de expresar una molécula de ácido nucleico” o capaz “de permitir la expresión de una secuencia de nucleótidos” si incluye elementos de secuencia que contienen información respecto a la regulación transcripcional y/o de la traducción, y dichas secuencias están “unidas de forma operativa” a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Una unión operativa es una unión en la que los elementos de secuencia reguladores y la secuencia que se va a expresar están conectados de manera tal que permite la expresión génica. La naturaleza precisa de las regiones reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar entre especies, pero en general estas regiones incluyen un promotor que, en procariotas, contiene tanto el promotor *per se*, es decir, elementos de ADN que dirigen el inicio de la transcripción, como elementos de ADN que, cuando se transcriben en ARN, señalarán el inicio de la traducción. Dichas regiones promotoras incluyen normalmente secuencias no codificadoras en 5' implicadas en el inicio de la transcripción y traducción, tales como las cajas -35/-10 y el elemento Shine-

Dalgarno en procariotas o la caja TATA, secuencias CAAT, y elementos de caperuza en 5' en eucariotas. Estas regiones también pueden incluir elementos potenciadores o represores así como secuencias señal y líder traducidas para dirigir el polipéptido nativo a un compartimento específico de una célula huésped.

5

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, descrita en esta solicitud puede estar "unida de forma operativa" a otra molécula de ácido nucleico de la descripción para permitir la expresión de una proteína de fusión de la descripción. A este respecto, una unión operativa es una unión en la que los elementos de secuencia de la primera

10 molécula de ácido nucleico y los elementos de secuencia de la segunda molécula de ácido nucleico están conectados de manera tal que permite la expresión de la proteína de fusión como un único polipéptido.

Además, las secuencias no codificadoras en 3' pueden contener elementos reguladores

15 implicados en la terminación transcripcional, poliadenilación o semejantes. Sin embargo, si estas secuencias de terminación no son funcionales de forma satisfactoria en una célula huésped particular, pueden sustituirse con señales funcionales en esa célula.

Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico de la invención puede incluir una secuencia

20 reguladora, tal como una secuencia promotora. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la invención incluye una secuencia promotora y una secuencia de terminación de la transcripción. Los promotores procariotas adecuados son, por ejemplo, el promotor *tet*, el promotor *lacUV5* o el promotor T7. Los ejemplos de promotores útiles para la expresión en células eucariotas son el promotor SV40 o el promotor CMV.

25

En una realización, la molécula de ácido nucleico está comprendida en un vector. El término "vector", tal y como se usa en la presente memoria, incluye cualesquiera vectores conocidos para el experto en la técnica, incluyendo vectores de plásmido, vectores de cósmido, vectores de fago, tales como fago lambda, fagémidos o fásmidos, vectores virales, tales como vectores

30 adenovirales o baculovirales, o vectores de cromosomas artificiales tales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC), o cromosomas artificiales P1 (PAC). Dichos vectores incluyen vectores de expresión así como de clonación. Los vectores de expresión comprenden plásmidos así como vectores virales y generalmente contienen una secuencia codificadora deseada y secuencias de ADN apropiadas necesarias

35 para la expresión de la secuencia codificadora unida de forma operativa en un organismo huésped particular (por ejemplo, bacteria, levadura, planta, insecto, o mamífero) o en sistemas de expresión *in vitro*. Los vectores de clonación se usan generalmente para preparar por ingeniería y amplificar un determinado fragmento de ADN deseado y pueden carecer de

secuencias funcionales necesarias para la expresión de los fragmentos de ADN deseados. En la técnica se conoce un gran número de vectores de expresión y clonación adecuados, y están disponibles comercialmente.

- 5 En una realización, la molécula de ácido nucleico está incluida en un fásmid. Un vector de fásmid indica un vector que codifica la región intergénica de un fago temperante, tal como M13 o f1, o una parte funcional de éste fusionada con el ADNc de interés. Después de la superinfección de las células huésped bacterianas con dicho vector de fásmid y un fago auxiliar apropiado (por ejemplo, M13K07, VCS-M13 o R408) se producen partículas de fago
- 10 intactas, permitiendo de esta manera el acoplamiento físico del ADNc heterólogo codificado a su polipéptido correspondiente presentado en la superficie del fago (véase, por ejemplo, Lowman, H.B. (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26, 401-424, o Rodi, D.J., y Makowski, L. (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10, 87-93).
- 15 La molécula de ADN que codifica una molécula de fusión como se describe en la presente memoria, y en particular un vector que contiene la secuencia codificadora de dicha molécula de fusión puede transformarse o transfectarse en una célula huésped capaz de expresar el gen. La transformación o transfección puede realizarse usando técnicas estándar. Así, la invención también está dirigida a una célula huésped que contiene una molécula de ácido nucleico como
- 20 se describe en la presente memoria.

En una realización, el término “célula” o “célula huésped” se refiere a una célula intacta, es decir, una célula con una membrana intacta que no ha liberado sus componentes intracelulares normales tales como enzimas, orgánulos, o material genético. En una realización, una célula

25 intacta es una célula viable, es decir, una célula viva capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas normales. En una realización, dicho término se refiere según la invención a cualquier célula que puede transfectarse o transformarse con un ácido nucleico exógeno. En una realización, la célula cuando se transfecta o transforma con un ácido nucleico exógeno y se transfiere a un receptor puede expresar el ácido nucleico en el receptor. El término “célula”

30 incluye células procariotas, tales como células bacterianas, y células eucariotas, tales como células de levadura, células fúngicas o células de mamífero. Las células bacterianas adecuadas incluyen células de cepas bacterianas gram-negativas, tales como cepas de *Escherichia coli*, *Proteus*, y *Pseudomonas*, y cepas bacterianas gram-positivas, tales como cepas de *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, y *Lactococcus*. Las células fúngicas

35 adecuadas incluyen células de las especies de *Trichoderma*, *Neurospora*, y *Aspergillus*. Las células de levadura adecuadas incluyen células de las especies *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (por ejemplo, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*), y *Hansenula*. Las células de

mamífero adecuadas incluyen células de mamífero primarias o líneas celulares de mamífero inmortalizadas, tales como células CHO, células BHK, células HeLa, células COS, 293 HEK y semejantes. Sin embargo, también pueden usarse células de anfibios, células de insecto (por ejemplo, SF9 o High5), células de plantas, y cualesquiera otras células usadas en la técnica para la expresión de proteínas heterólogas.

La invención también se refiere a un método para la producción de una molécula de fusión como se describe en la presente memoria, en el que la molécula de fusión se produce empezando a partir del ácido nucleico que codifica la molécula de fusión mediante métodos de ingeniería genética. El método puede llevarse a cabo *in vivo*, la molécula de fusión puede producirse, por ejemplo, en un organismo/célula huésped bacteriano o eucariota y aislarse de este organismo/célula huésped o su cultivo. También es posible producir una proteína *in vitro*, por ejemplo por el uso de un sistema de traducción *in vitro*.

Cuando la molécula de fusión se produce *in vivo* un ácido nucleico que codifica dicha molécula de fusión se introduce en un organismo/célula huésped bacteriano o eucariota adecuado mediante tecnología de ADN recombinante (como ya se ha indicado anteriormente). Para este propósito, la célula huésped se transforma en primer lugar con un vector de clonación que incluye una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de fusión como se describe en la presente memoria usando métodos estándar establecidos. La célula huésped se cultiva entonces en condiciones que permiten la expresión del ADN heterólogo y así la síntesis del polipéptido correspondiente. Posteriormente, el polipéptido se recupera bien de la célula o del medio de cultivo.

En algunas realizaciones, el enlace disulfuro natural entre Cys 76 y Cys 175 puede eliminarse en las muteínas de hNGAL usadas en las moléculas de fusión. De acuerdo con esto, dichas muteínas pueden producirse en un compartimento celular que tiene un medio redox reductor, por ejemplo, en el citoplasma de bacterias Gram-negativas.

En el caso de que una molécula de fusión de la invención incluya enlaces disulfuro intramoleculares, puede preferirse dirigir el polipéptido nascente a un compartimento celular que tenga un medio redox oxidante usando una secuencia señal apropiada. Dicho entorno oxidante puede proporcionarse por el periplasma de bacterias Gram-negativas tales como *E. coli*, en el medio extracelular de bacterias Gram-positivas o en el lumen del retículo endoplásmico de células eucariotas y habitualmente favorece la formación de enlaces disulfuro estructurales.

Sin embargo, también es posible producir una molécula de fusión de la invención en el citosol de una célula huésped, particularmente *E. coli*. En este caso, la molécula de fusión puede

obtenerse bien directamente en un estado soluble y plegado o recuperarse en forma de cuerpos de inclusión, seguido de renaturalización *in vitro*. Una opción adicional es el uso de cepas huésped específicas que tienen un medio intracelular oxidante, que puede permitir así la formación de enlaces disulfuro en el citosol (Venturi et al. (2002) J. Mol. Biol. 315, 1-8.).

5

Sin embargo, la molécula de fusión como se describe en la presente memoria puede no generarse o producirse necesariamente sólo por el uso de ingeniería genética. En lugar de esto, dicha molécula de fusión también puede obtenerse por síntesis química tal como síntesis de polipéptidos en fase sólida Merrifield o por transcripción y traducción *in vitro*. Los métodos
10 para la síntesis en fase sólida y/o fase de disolución de proteínas son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Bruckdorfer, T. et al. (2004) Curr. Pharm. Biotechnol. 5, 29-43), y también lo son los métodos para transcripción/traducción *in vitro*. También es posible que se identifiquen las mutaciones prometedoras usando modelado molecular y después sintetizar el polipéptido querido (diseñado) *in vitro* e investigar la actividad de unión para pioverdina tipo I, II,
15 III y/o pioquelina. Los métodos para la síntesis en fase sólida y/o fase disolución de proteínas son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Bruckdorfer, T. et al. (2004) Curr. Pharm. Biotechnol. 5, 29-43).

El experto en la técnica apreciará métodos útiles para preparar moléculas de fusión
20 contempladas por la presente invención pero cuyas secuencias de proteína o ácido nucleico no se describen explícitamente en la presente memoria. Como una visión global, dichas modificaciones de la secuencia de aminoácidos incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida de posiciones simples de aminoácidos con el fin de simplificar la sub-clonación de un gen de una muteína de hNGAL o sus partes incorporando sitios de escisión para determinadas enzimas de
25 restricción. Además, estas mutaciones también pueden incorporarse para mejorar adicionalmente la afinidad de una muteína para su diana (por ejemplo, pioverdina o pioquelina, respectivamente). Además, las mutaciones pueden introducirse para modular determinadas características de las muteínas y moléculas de fusión, tales como para mejorar la estabilidad de plegamiento, estabilidad en suero, resistencia a proteínas o solubilidad en agua o para
30 reducir la tendencia a la agregación, si es necesario. Por ejemplo, los residuos de cisteína naturales pueden mutarse a otros aminoácidos para prevenir la formación de puentes disulfuro.

La presente descripción también se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una muteína descrita en la presente memoria. A
35 este respecto, la presente descripción proporciona secuencias de nucleótidos que codifican algunas muteínas de la descripción como se muestra en SEQ ID NOs: 65-126. Debido a que la degeneración del código genético permite sustituciones de determinados codones por otros codones que especifican el mismo aminoácido, la descripción no está limitada a una molécula

de ácido nucleico específica que codifica una muteína como se describe en la presente memoria sino que engloba todas las moléculas de ácido nucleico que incluyen secuencias de nucleótidos que codifican una muteína funcional. La descripción engloba además una célula huésped que contiene dicha molécula de ácido nucleico. Todos los aspectos y realizaciones referidas a moléculas de ácido nucleico y células (huésped) descritos en conexión con las moléculas de fusión de la presente invención también son aplicables a muteínas simples y sus combinaciones. Lo mismo se aplica a los métodos para su producción.

D. Composiciones y kits

En un aspecto más, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una molécula de fusión como se define en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico como se define en la presente memoria, o una célula como se define en la presente memoria.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención son estériles y/o contienen una cantidad efectiva de las moléculas de fusión, moléculas de ácido nucleico o células descritas en la presente memoria para generar la reacción deseada o el efecto deseado.

El término “cantidad efectiva”, tal y como se usa a lo largo de la descripción, se refiere a una cantidad que es suficiente para ejercer resultados beneficiosos o deseados, en la que una cantidad efectiva puede administrarse en una o más administraciones. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular o de una afección particular, el resultado beneficioso o deseado se refiere particularmente a la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende ralentizar la progresión de la enfermedad y, en particular, interrumpir o revertir la progresión de la enfermedad. El resultado beneficioso o deseado en un tratamiento de una enfermedad o de una afección también puede ser el retraso del inicio o una prevención del inicio de dicha enfermedad o dicha afección. Una cantidad efectiva de un agente o composición descrita en la presente memoria dependerá de la afección que se va a tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del sujeto, incluyendo edad, condición fisiológica, tamaño y peso, la duración del tratamiento, el tipo de terapia acompañante (si está presente), la ruta específica de administración y factores similares. De acuerdo con esto, las dosis administradas de los agentes descritos en la presente memoria pueden depender de varios de dichos parámetros. En el caso de que una reacción en un sujeto sea insuficiente con una dosis inicial, pueden usarse dosis más altas (o conseguirse dosis mayores efectivamente por una ruta de administración diferente, más localizada).

Las composiciones farmacéuticas se proporcionan habitualmente en una forma de dosificación uniforme y pueden prepararse de una manera conocida *per se*. Una composición farmacéutica puede estar, por ejemplo, en la forma de una disolución o suspensión.

- 5 Una composición farmacéutica puede comprender además uno o más vehículos y/o excipientes, todos los cuales son, en realizaciones particulares, farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la ausencia de toxicidad de un material que, en realizaciones particulares, no interacciona con la acción del agente activo de la composición farmacéutica.

10 El término "vehículo" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de naturaleza natural o sintética, en el que el componente activo se combina con el fin de facilitar, potenciar o permitir la aplicación. Según la invención, el término "vehículo" también incluye uno o más materiales de relleno sólidos o líquidos, diluyentes o sustancias encapsulantes compatibles, que son
15 adecuados para administración a un sujeto.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral comprenden habitualmente una preparación estéril acuosa o no acuosa del compuesto activo, que, en una realización particular, es isotónica para la sangre del receptor. Los ejemplos de
20 vehículos/disolventes/diluyentes compatibles para administración parenteral son, por ejemplo, agua estéril, disolución de Ringer, lactato de Ringer, disolución isotónica de cloruro de sodio, polialquilen glicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros láctido biocompatibles, copolímeros láctido/glicólido o copolímeros polioxietileno/polioxi-propileno. Además, se usan habitualmente aceites estériles, no volátiles como medio de disolución o suspensión.

25 El término "excipiente", tal y como se usa en la presente memoria, se pretende que incluya todas las sustancias que pueden estar presentes en una composición farmacéutica y que no son ingredientes activos, tales como sales, aglutinantes, lubricantes, espesantes, agentes tensioactivos, conservantes, emulsionantes, sustancias tamponadoras, agentes saporíferos, o
30 colorantes.

Las sales, que no son farmacéuticamente aceptables, pueden usarse para preparar sales farmacéuticamente aceptables y están incluidas en la invención. Las sales farmacéuticamente aceptables de esta clase comprenden de manera no limitativa aquellas preparadas a partir de
35 los ácidos siguientes: ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico, y semejantes. Las sales farmacéuticamente aceptables también pueden prepararse como sales de metal alcalino o sales de metal alcalinotérreo, tales como sales de sodio, sales de potasio o sales de calcio.

Los conservantes adecuados para uso en una composición farmacéutica incluyen cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y timerosal.

- 5 Las sustancias tamponadoras adecuadas para uso en una composición farmacéutica incluyen ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.

10 La composición farmacéutica también puede comprender uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

En una realización, la composición farmacéutica se formula para administración sistémica, en particular administración parenteral (por ejemplo, subcutánea). En otra realización, la composición farmacéutica se formula para inhalación.

15 En una realización, la composición farmacéutica comprende además un agente farmacéuticamente activo adicional.

20 En una realización, el agente farmacéuticamente activo adicional se selecciona del grupo que consiste en un antibiótico, un agente citostático, una toxina, una enzima, un metal o compuesto/complejo metálico, un agente quelante, un radionúclido, una molécula orgánica pequeña, un péptido terapéuticamente activo, una molécula de ácido nucleico terapéuticamente activa, un hapteno y un anticuerpo. Los antibióticos adecuados incluyen Tobramicina, Azitromicina, Aztreonam, Colistina y carbapenemos.

25 Los metales o compuestos/complejos metálicos adecuados son galio, compuestos de galio y complejos basados en galio.

30 El término “molécula orgánica pequeña”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula orgánica que comprende al menos dos átomos de carbono, pero preferiblemente no más de 7 ó 12 enlaces de carbono orientables, que tiene un peso molecular en el intervalo entre 100 y 2.000 Dalton, particularmente entre 100 y 1.000 Dalton, o < 900 Dalton, y opcionalmente que incluye uno o dos átomos de metal.

35 El término “péptido terapéuticamente activo” se refiere, por ejemplo, a péptidos que actúan como agonistas/antagonistas de un receptor de la superficie celular o péptidos que compiten para un sitio de unión de proteína en una diana celular dada.

El término “molécula de ácido nucleico terapéuticamente activa” se refiere, por ejemplo, a moléculas de ácido nucleico antisentido, ARN de interferencia pequeños, micro ARN o ribozimas.

5 Los agentes farmacéuticamente activos adicionales particulares, con los que pueden combinarse las moléculas de fusión de la presente invención, incluyen Dornasa alfa, corticosteroides, modificadores de leucotrieno, N-acetilcisteína, glutatión inhalado, anticolinérgicos, ibuprofeno y agonistas del receptor β 2-adrenérgico.

10 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un kit que comprende una molécula de fusión como se ha definido en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico como se ha definido en la presente memoria, una célula como se ha definido en la presente memoria, o una composición farmacéutica como se ha definido en la presente memoria. El kit puede ser un kit de diagnóstico o analítico.

15 Tal y como se usa en la presente memoria, el término “kit de partes (abreviado: kit)” se refiere a un artículo de fabricación que comprende uno o más contenedores y, opcionalmente, un portador de datos. Dichos uno o más contenedores pueden llenarse con uno o más de los medios o reactivos descritos en la presente memoria. Pueden incluirse contenedores
20 adicionales en el kit que contienen, por ejemplo, diluyentes, tampones y reactivos adicionales. Dicho portador de datos puede ser un portador de datos no electrónico, por ejemplo, un portador de datos gráfico tal como un panfleto informativo, una hoja informativa, un código de barras o un código de acceso, o un portador de datos electrónico tal como un disco compacto (CD), un disco digital versátil (DVD), un microchip u otro portador de datos electrónico basado
25 en semiconductor. El código de acceso puede permitir el acceso a una base de datos, por ejemplo, una base de datos de internet, una base de datos centralizada, o descentralizada. Dicho portador de datos puede comprender instrucciones para el uso de la molécula de fusión, molécula de ácido nucleico, células y/o composición farmacéutica de la presente invención.

30 Todos los aspectos y realizaciones referidas a composiciones y kits descritos en conexión con las moléculas de fusión de la presente invención también son aplicables a muteínas simples y sus combinaciones.

E. Aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas

35 Las pioverdinas son los sideróforos principales de pseudomonas tales como *P. aeruginosa*. Los experimentos *in vitro* indicaron un papel potencial de la pioverdina de *P. aeruginosa* en la liberación de hierro de ferritransferrina pero la capacidad de pioverdina para competir para el

hierro *in vivo* se ha demostrado sólo recientemente (Meyer et al., 1996, Infection and Immunity, 64, p.518-523). Se observó usando un modelo de ratón quemado que la ausencia de producción de pioverdina en mutantes producidos a partir de una cepa parental virulenta se correlacionaba con una pérdida de virulencia de estos mutantes y que la virulencia se restauró cuando se suplementó la pioverdina homóloga originada de la cepa de tipo salvaje. Además, el suplemento con una pioverdina heteróloga no restauró la virulencia de los últimos mutantes. Así, un conocimiento preciso del sistema de captación de hierro mediado por pioverdina usado por un aislado dado de *P. aeruginosa* durante la infección parece un prerequisite para el desarrollo de nuevas vías de tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa* a través del metabolismo del hierro bacteriano, por ejemplo, bloqueando la biosíntesis de pioverdina o el transporte de hierro mediado por pioverdina.

La pioquelina (Pch) es uno de los dos sideróforos principales producidos y secretados por *Pseudomonas aeruginosa* para asimilar el hierro. Quela el hierro en el medio extracelular y lo transporta al interior de la célula mediante un transportador de membrana externo específico, FptA. Pch quela fuertemente metales divalentes tales como Zn(II) ($pZn = 11,8$ a $p[H] 7,4$) y Cu(II) ($pCu = 14,9$ a $p[H] 7,4$) y forma predominantemente complejos 1 : 2 (M^{2+}/Pch). Los sideróforos no sólo están dedicados al transporte de hierro(III) sino que lo más probablemente presentan otros papeles biológicos específicos en la homeostasis de metales sutil en los microorganismos.

Por lo tanto, existen en medicina numerosas aplicaciones posibles para las moléculas de fusión que se unen a pioverdina/pioquelina de la invención.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de fusión como se ha definido en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico como se ha definido en la presente memoria, una célula como se ha definido en la presente memoria, o una composición farmacéutica como se ha definido en la presente memoria para uso como un medicamento.

El término “medicamento”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una sustancia/composición usada en terapia, es decir, en el tratamiento de una enfermedad.

El término “tratamiento de una enfermedad”, tal y como se usa en la presente memoria, incluye curar, acortar la duración, mejorar, prevenir, ralentizar o inhibir la progresión o empeoramiento, o prevenir o retrasar el inicio de una enfermedad o los síntomas de ésta.

Según la invención, el término “enfermedad” se refiere a cualquier estado patológico, en particular una enfermedad o trastorno asociado con o causado por una infección por biopelícula de *P. aeruginosa* en un sujeto.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de fusión como se ha definido en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico como se ha definido en la presente memoria, una célula como se ha definido en la presente memoria, o una composición farmacéutica como se ha definido en la presente memoria para uso en la prevención o tratamiento de una infección por biopelícula de *P. aeruginosa* en un sujeto.

El termino "sujeto", tal y como se usa a lo largo de la descripción, significa según la invención un sujeto para tratamiento o diagnóstico, en particular un sujeto enfermo (también referido como "paciente") o un sujeto que se espera/asume/está en riesgo de estar enfermo. Un "sujeto" es un vertebrado, particularmente un mamífero. El término "mamífero" se usa en la presente memoria para hacer referencia a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo, sin limitación, seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, utilizados en deportes, o mascotas, tales como ovejas, perros, caballos, gatos, vacas, ratas, cerdos, monos tales como monos cinomolgus etc., por nombrar solo unos pocos ejemplos ilustrativos.

En una realización particular, el mamífero es un ser humano.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una molécula de fusión como se ha definido en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico como se ha definido en la presente memoria, una célula como se ha definido en la presente memoria, o una composición farmacéutica como se ha definido en la presente memoria para uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con o causado por una infección por biopelícula de *P. aeruginosa* en un sujeto.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para prevenir o tratar una infección por biopelícula de *P. aeruginosa* en un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva de una molécula de fusión como se ha definido en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico como se ha definido en la presente memoria, una célula como se ha definido en la presente memoria, o una composición farmacéutica como se ha definido en la presente memoria al sujeto.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno asociado con o causado por una infección por biopelícula de *P. aeruginosa* en un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva de una molécula de fusión como se ha definido en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico como se ha definido en la presente memoria, una célula como se ha definido en la presente memoria, o una composición farmacéutica como se ha definido en la presente memoria al sujeto.

En una realización, la infección por biopelícula de *P. aeruginosa* es infección aguda o crónica.

En una realización, la enfermedad o trastorno asociado con o causado por una infección por biopelícula de *P. aeruginosa* se selecciona del grupo que consiste en fibrosis quística, neumonía adquirida en hospital, neumonía asociada a ventilador, infección del tracto urinario, infección ocular, infección de oídos e infección por herida de quemadura.

5

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a una molécula de fusión como se ha definido en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico como se ha definido en la presente memoria, una célula como se ha definido en la presente memoria, o una composición farmacéutica como se ha definido en la presente memoria para uso en la unión de pioverdina (tipo I, II y/o III) y/o pioquelina en un sujeto y/o inhibir o disminuir el crecimiento de *P. aeruginosa* en un sujeto.

10

En otro aspecto más, la presente invención presenta un método para unir pioverdina (tipo I, II y/o III) y/o pioquelina en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una molécula de fusión como se ha definido en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico como se ha definido en la presente memoria, una célula como se ha definido en la presente memoria, o una composición farmacéutica como se ha definido en la presente memoria.

15

En otro aspecto más, la presente invención presenta un método para inhibir o disminuir el crecimiento de *P. aeruginosa* en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de una molécula de fusión como se ha definido en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico como se ha definido en la presente memoria, una célula como se ha definido en la presente memoria, o una composición farmacéutica como se ha definido en la presente memoria.

20

25

En un aspecto adicional más, la presente invención se refiere al uso de una molécula de fusión como se ha definido en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico como se ha definido en la presente memoria, una célula como se ha definido en la presente memoria, o una composición farmacéutica como se ha definido en la presente memoria en la fabricación de un medicamento para (i) la prevención o tratamiento de una infección por biopelícula de *P. aeruginosa* en un sujeto, (ii) la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con o causado por una infección por biopelícula de *P. aeruginosa* en un sujeto, o (iii) inhibir o disminuir el crecimiento de *P. aeruginosa* en un sujeto.

30

35

Los agentes y composiciones descritos en la presente memoria pueden administrarse a través de cualquier ruta convencional, tal como por administración tópica o sistémica (es decir, entérica o parenteral). La administración parenteral incluye inyección o infusión, por ejemplo,

por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica o intramuscular. La administración tópica incluye inhalación así como gotas oculares y de oído. En realizaciones particulares, las moléculas de fusión de la invención se administran por inhalación (moléculas de fusión) o sistémicamente, por ejemplo, subcutáneamente (construcciones de molécula de fusión con Fc).

5

La presente invención se refiere además al uso de una molécula de fusión descrita en la presente memoria para detectar pioverdina (tipo I, II y/o III) y/o pioquelina en una muestra así como un método respectivo de diagnóstico.

El término “detectar”, “detección”, “detectable” o “que detecta” tal y como se usa en la presente memoria se entiende tanto a nivel cuantitativo como cualitativo, así como una combinación de éstos. Así, incluye medidas cuantitativas, semi-cuantitativas y cualitativas de una molécula de interés.

Dicho uso puede incluir las etapas de poner en contacto una o más moléculas de fusión, en condiciones adecuadas, con una muestra que se sospecha que contiene pioverdina y/o pioquelina, permitiendo de esta manera la formación de un complejo entre la molécula de fusión y pioverdina (tipo I, II y/o III) y/o pioquelina, y detectar el complejo mediante una señal adecuada. La señal puede causarse por un marcaje, como se ha explicado anteriormente, o por un cambio de las propiedades físicas debido a la unión, es decir, la formación del complejo, en sí mismo. Un ejemplo es la resonancia de plasmón superficial, cuyo valor cambia durante la unión de parejas de unión de las cuales una está inmovilizada en una superficie tal como una lámina de oro.

Las moléculas de fusión descritas en la presente memoria también pueden usarse para la separación de pioverdina y/o pioquelina. Dicho uso puede incluir las etapas de poner en contacto dicha molécula de fusión, en condiciones adecuadas, con una muestra que se supone que contiene pioverdina y/o pioquelina, permitiendo de esta manera la formación de un complejo entre la molécula de fusión y pioverdina y/o entre la molécula de fusión y pioquelina, respectivamente, y separar el complejo de la muestra.

En el uso de las moléculas de fusión descritas para la detección de pioverdina y/o pioquelina así como la separación de pioverdina y/o pioquelina, las moléculas de fusión y/o pioverdina y/o pioquelina o un dominio o fragmentos de éstas puede inmovilizarse en una fase sólida adecuada.

De acuerdo con esto, puede determinarse la presencia o ausencia de pioverdina y/o pioquelina, por ejemplo, en una muestra, así como su concentración o nivel.

Una “muestra” se define como una muestra biológica tomada de cualquier sujeto. Las muestras biológicas incluyen, pero no están limitadas a, sangre, suero, orina, heces, semen, o tejido.

Las moléculas de fusión descritas en la presente memoria pueden usarse en muchos campos de manera similar a anticuerpos o fragmentos de éstos. Por ejemplo, las moléculas de fusión pueden usarse para marcar con una enzima, un anticuerpo, una sustancia radiactiva o cualquier otro grupo que tiene actividad bioquímica o características de unión definidas. Haciendo esto, sus dianas respectivas pueden detectarse o ponerse en contacto con ellas. Además, las moléculas de fusión de la invención pueden servir para detectar estructuras químicas mediante métodos analíticos establecidos (por ejemplo, ELISA o Transferencia Western) o por microscopía o inmunosensores. A este respecto, la señal de detección puede generarse bien directamente por el uso de un conjugado de molécula de fusión adecuado o indirectamente por detección inmunoquímica de la molécula de fusión unida mediante un anticuerpo.

Todos los aspectos y realizaciones referidas a aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas descritos en conexión con las moléculas de fusión de la presente invención también son aplicables a muteínas simples y sus combinaciones.

Los objetos, ventajas, y características adicionales de esta invención serán evidentes para los expertos en la técnica después del examen de los Ejemplos siguientes y las Figuras adjuntas de éstos, que no se pretende que sean limitativos. Así, debe entenderse que aunque la presente invención se describe específicamente por realizaciones ejemplares y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a modificaciones y variaciones de las descripciones incluidas en la presente memoria, y que se considera que dichas modificaciones y variaciones están en el alcance de esta invención. En particular, todos los aspectos y realizaciones descritos en conexión con las moléculas de fusión de la invención también son aplicables a muteínas simples descritas en la presente memoria así como a sus combinaciones, y vice versa.

VI. EJEMPLOS

Ejemplo 1: Purificación y biotinilación de sideróforos de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa produce tres grupos de pioverdinas, es decir, pioverdina tipo I, pioverdina tipo II y pioverdina tipo III. Cada grupo tiene tres formas que se diferencian en la cadena lateral que es succinilo, succinamida o α -cetoglutarilo. Además, *P. aeruginosa* produce pioquelina. Todos los diez sideróforos pueden formar complejos con hierro como Fe^{3+} .

Para la selección y cribado de muteínas de interés, los sideróforos pueden biotinilarse. La biotinilación se realizó para la variante pioverdina I succinilo en la cadena lateral succinilo, para la variante pioverdina II succinilo en la cadena lateral L-ornitina y para la variante pioverdina III succinilo principalmente en la cadena lateral glicina. La pioquelina se biotiniló en el anillo fenol.

Ejemplo 2: Selección de muteínas que se unen específicamente a sideróforos de *P. aeruginosa*

Se usaron bibliotecas basadas en hNGAL, generadas por mutagénesis aleatoria de hNGAL madura, para la selección de muteínas que se unen específicamente a los diferentes sideróforos de *P. aeruginosa*. Se usaron Pvd I succinilo, Pvd II succinilo, y Pvd III succinilo biotinilados y cargados con hierro así como pioquelina biotinilada no cargada con hierro en procesos independientes de exposición en fago y selección.

Se incubaron 2×10^{12} fagémidos de estas bibliotecas con 200 nM ó 500 nM ó 1 μ M de diana biotinilada. Se usaron lechos paramagnéticos recubiertos con neutravidina o estreptavidina para capturar los complejos diana/fagémido que posteriormente se aislaron con un imán. Los fagémidos no unidos se eliminaron lavando los lechos con PBST o PBS. Los fagémidos unidos se eluyeron en primer lugar con 300 μ l de 70 mM trietilamina durante 10 min seguido de neutralización inmediata del sobrenadante con 100 μ l de 1M Tris-Cl pH 6,0. Después de un ciclo de lavado intermedio, los fagémidos remanentes se eluyeron con 100 mM glicina pH2,2 durante 10 min seguido de neutralización inmediata con 50 μ l de 0,5 M Tris-base. Las dos fracciones de elución se combinaron y se usaron para infectar 4 ml de cultivo de *E. coli* XL1-blue (DO_{550} 0,45-0,6) para reamplificación. Después de incubar durante 30 min con agitación, las bacterias se recogieron por centrifugación a 5.000xg durante 2 min, se resuspendieron en 1 ml de medio 2xYT y se sembraron en placas en tres placas de agar grandes LB/Amp (10 g/l bacto triptona, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl, pH 7,5, 15 g/l agar, 100 μ g/ml ampicilina). Las placas se incubaron toda la noche a 32°C. Las células infectadas se rasparon de las placas de agar usando 50 ml de medio 2xYT suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina (2xYT/Amp). Se inocularon 50 ml de medio 2xYT/Amp con el volumen aproximado de suspensión bacteriana para alcanzar una DO_{550} de 0,08. El cultivo se incubó a 37°C en un agitador (160 rpm) hasta que se alcanzó una DO_{550} de 0,5 y después se infectaron con fagos auxiliares ($1,5 \times 10^{11}$ pfu) por incubación durante 15 min con agitación suave y durante 45 min en un agitador a 37°C. Posteriormente, se añadió kanamicina a una concentración final de 70 μ g/ml para seleccionar las bacterias infectadas por los fagos auxiliares. Finalmente, se indujo la expresión de las muteínas pIII-hNGAL por adición de 25 ng/ml de anhidrotetraciclina.

Después de 15 h de incubación a 24°C, el sobrenadante del cultivo se aclaró por centrifugación

(5.000xg durante 20 min). Posteriormente, se pasaron 20 ml de sobrenadante a través de una membrana de poliétersulfona con un tamaño de poro de 0,22 µm. Al filtrado, se añadieron 5 ml de una disolución que contenía 20% (p/v) PEG-8000 y 15% (p/v) NaCl en agua y se mezcló suavemente. La disolución se incubó durante 30 min en hielo antes de centrifugación durante 20 min a 4°C y 5.000xg. El sedimento que contenía los fagémidos se disolvió en 1 ml de tampón que contenía 200 mM ácido bórico, 160 mM NaCl y 1 mM EDTA. Las partículas insolubles se eliminaron por centrifugación (5.000xg durante 5 min). El sobrenadante se transfirió a un tubo fresco y se mezcló con 200 µl de una disolución que contenía 20% (p/v) PEG-8000 y 15% (p/v) NaCl en agua. La disolución se incubó 30 min en hielo y los fagémidos precipitados se recogieron posteriormente por centrifugación (5.000xg durante 5 min). Los fagémidos se resuspendieron en PBS suplementado con 50 mM benzamidina y se usaron para la ronda siguiente de selección de fagémidos.

Se realizaron cuatro rondas consecutivas de selección. Se aplicaron diferentes condiciones de lavado: i) ocho veces con 1 ml de PBS/T 5 min de incubación para cada etapa de lavado en las 4 rondas de selección, ii) el número de ciclos de lavado se incrementó de la ronda 1 a 4 iii) las etapas de lavado rápido se alteraron con etapas de lavado con 5 min de incubación y el número de etapas de lavado se incrementó de ronda en ronda.

El ADN de fagémido se preparó a partir de células de *E. coli* infectadas con el resultado de la cuarta ronda de selección y el casete de la muteína de hNGAL se aisló por digestión del ADN con BstX1 y purificación posterior mediante electroforesis en gel de agarosa usando métodos estándar (Sambrook et al., (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*). El casete de la muteína de hNGAL se insertó en el vector cortado de la misma manera, lo que permite la producción bacteriana de las muteínas de hNGAL bajo el control de un promotor de tetraciclina. Se transformaron células TG1-F' competentes CaCl₂ con la mezcla de ligación y se sembraron en placas en placas LB/Amp.

Para la optimización de las muteínas específicas de Pvd I, Pvd II, Pvd III y Pch, se generaron bibliotecas adicionales basadas en la muteína SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 y posteriormente SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 45. Se generaron bibliotecas usando bien una aleatorización sesgada de posiciones seleccionadas o métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tendente a error. La selección de muteínas se realizó como se ha descrito pero con astringencia incrementada.

Con el fin de facilitar la expresión en células eucariotas, se eliminaron los sitios potenciales de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr).

Además, se introdujeron mutaciones para optimizar adicionalmente la estabilidad.

Ejemplo 3: Identificación de muteínas que se unen específicamente a los sideróforos respectivos de *P. aeruginosa* usando cribado por ELISA de alto rendimiento

Se usaron colonias individuales para inocular medio 2xYT/Amp y se crecieron toda la noche (14-18 h) hasta la fase estacionaria. Posteriormente, se inocularon 50 µl de 2xYT/Amp de los cultivos de la fase estacionaria y se incubó durante 3h a 37°C y después se cambió a 22°C hasta que se alcanzó una DO₅₉₅ de 0,6-0,8. Se indujo la producción de muteínas por la adición de 10 µl de 2xYT/Amp suplementado con 1,2 µg/ml de anhidrotetraciclina. Los cultivos se incubaron a 22°C hasta el día siguiente. Después de la adición de 40 µl de 5% (p/v) BSA en PBS/T e incubación durante 1h a 25°C, los cultivos estaban listos para usarse en los ensayos de cribado.

La unión específica de las muteínas aisladas a las dianas sideróforo respectivas se ensayó utilizando una mezcla 1:1 de neutravidina y estreptavidina (5 µg/ml en PBS) para recubrir toda la noche a 4°C placas de microtitulación. Después de bloquear la placa 1h con 2% BSA en PBST, la diana sideróforo biotinilada respectiva usada para la selección se capturó en las placas de microtitulación recubiertas a una concentración de 1,5 – 2,5µg/ml en PBS/T. Las placas recubiertas de la misma manera con aldosterona biotinilada se usaron como diana control negativo en el cribado. Posteriormente, se añadieron 20 µl de cultivos bloqueados con BSA a la placa de microtitulación recubierta que contenía bien diana capturada o aldosterona y se incubó durante 1h a 25°C. Las muteínas unidas se detectaron después de 1h de incubación con anticuerpo anti-T7 conjugado con peroxidasa de rábano (Merck KgaA, Darmstadt) o anticuerpo anti-Strep-tag® conjugado con peroxidasa de rábano (IBA, Boettingen). Para la cuantificación, se añadieron 20 µl de sustrato de peroxidasa fluorogénico QuantaBlu y la fluorescencia se determinó a una longitud de onda de excitación de 320 nm y una longitud de onda de emisión de 430 nm. Las muteínas que se unían específicamente a las dianas sideróforo respectivas se secuenciaron.

Para seleccionar muteínas con afinidad y estabilidad incrementadas, el cribado se realizó con i) concentración reducida de antígeno y/o ii) competición con diana no biotinilada y/o iii) incubación del sobrenadante del cribado a 65°C ó 70°C antes de la adición a la placa diana y/o iv) usando formatos de cribado inverso donde las muteínas se capturaron mediante la Strep-tag® en placas de microtitulación recubiertas con anticuerpo anti-Strep-tag® y se añadieron diferentes concentraciones de diana biotinilada y se detectaron mediante extravidina-HRP (Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

Ejemplo 4: Expresión de muteínas

Se expresaron muteínas simples con secuencia C-terminal SAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 127; incluyendo el conector SA y la Strep-tag® II, WSHPQFEK (SEQ ID NO: 128) en *E. coli* en medio 2YT-Amp para purificar las muteínas después de la expresión usando cromatografía de afinidad Streptactin y cromatografía de exclusión por tamaño preparativa cuando sea aplicable.

Ejemplo 5: Afinidad de las muteínaa para sideróforos solubles de *P. aeruginosa* determinada en un marco basado en ELISA

La unión en disolución de las muteínas se ensayó por un "ELISA de unión en disolución", cuyo principio fue como sigue: se incubó una concentración constante de la muteína ensayada con concentraciones variables de ligandos (Pvd I s, sa, aKG +/-Fe / Pvd II s, sa, aKG +/-Fe / Pvd III s, sa, aKG +/-Fe / Pch +/-Fe) durante 1 h. Después de esta pre-incubación en disolución, se transfirió una alícuota de la mezcla muteína/ligando a una placa ELISA con Pvd I s (+Fe), Pvd II s (+Fe), Pvd III s (+Fe) o Pch biotinilada inmovilizada mediante Neutravidina para medir la concentración remanente de muteínas libres. La concentración de muteínas libres (no unidas a ligando) se determinó mediante un ajuste ELISA cuantitativo.

Con detalle, una placa de 384 pocillos adecuada para medidas de fluorescencia (Greiner FLUOTRAC™ 600, fondo plano negro, alta unión) se recubrió con 20 µl de Neutravidina a una concentración de 5 µg/ml en PBS toda la noche a 4°C. Después de lavar, los pocillos recubiertos con Neutravidina se bloquearon con 100 µl de tampón de bloqueo que contenía 0,1% Tween 20 y 2% BSA (PBS-T/BSA) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar de nuevo, se añadieron 20 µl de pioverdina o pioquelina biotinilada en tampón de bloqueo a una concentración de 1 µg/mL durante 1 h a temperatura ambiente y el reactivo en exceso se eliminó.

Se incubó una concentración fija de muteínas en disolución con varias concentraciones de ligando (Pvd I s, sa, aKG +/-Fe / Pvd II s, sa, aKG +/-Fe / Pvd III s, sa, aKG +/-Fe / Pch +/-Fe), usando una concentración de partida adecuada que se diluyó de forma seriada a una proporción 1:3 hacia abajo hasta el rango picomolar en PBS-T/BSA. Después de 1h de incubación a temperatura ambiente, se transfirieron 20 µl de la mezcla de reacción a la placa de 384 pocillos después de lo cual se inmovilizó pioverdina o pioquelina biotinilada para capturar las muteínas no unidas (libres) durante 20 min a RT. Para permitir la transformación de los resultados de lectura ELISA en concentraciones absolutas de muteína libre, se preparó una curva estándar que contenía varias concentraciones de muteínas en PBS-T/BSA y se incubó también durante 20 min en la misma placa ELISA.

Los sobrenadantes residuales se desecharon y se añadieron 20 µl de anticuerpo anti-hNGAL marcado con HRP a una concentración óptima predeterminada en PBS-T/BSA y se incubó durante 1 h a RT. El anticuerpo anti-hNGAL se había obtenido por inmunización de conejos con una mezcla de muteínas, y se acopló posteriormente a HRP usando un kit (EZ-link Plus Activated Peroxidase, Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante, para obtener el conjugado anticuerpo-HRP. Después de lavar, se añadieron 20 µl de sustrato de HRP fluorogénico (QuantaBlu, Thermo) a cada pocillo, y la reacción se dejó proceder durante 15 a 60 minutos. La intensidad de fluorescencia de cada pocillo en la placa se leyó usando un lector de fluorescencia en microplacas (Tecan o Molecular Devices). Para evaluar los datos, se calculó la concentración de muteína libre, $c(\text{muteína})_{\text{libre}}$, sobre la base de los resultados de la curva estándar, y se representaron frente a la concentración de ligando, $c(\text{Ligando})$. Para obtener la concentración de ligando a la que se bloqueó la formación de complejo ligando/muteína un 50% (CI_{50}), las curvas se ajustaron por regresión no lineal con un modelo de unión de un único sitio según $c(\text{muteína})_{\text{libre}} = c(\text{muteína})_{\text{tot}} / (1 + c(\text{Ligando}) / CI_{50})$, con la concentración total de trazador $c(\text{muteína})_{\text{tot}}$ y el valor CI_{50} como parámetros libres. El ajuste de las curvas se realizó usando software GraphPad Prism 4.

Los valores CI_{50} resultantes se resumen en las Tablas 1A-D. Las muteínas seleccionadas frente a Pvd I succinilo, Pvd II succinilo y Pvd III succinilo biotiniladas y cargadas con hierro, respectivamente, se unieron a todos los subtipos del grupo Pvd respectivo, es decir, las muteínas seleccionadas frente a Pvd I succinilo biotinilada y cargada con hierro se unieron con afinidad similar a Pvd I succinilo, -succinamida, - α -cetoglutarilo con o sin ión hierro en complejo, las muteínas seleccionadas frente a Pvd II succinilo biotinilada y cargada con hierro se unieron con afinidad similar a Pvd II succinilo, -succinamida, - α -cetoglutarilo con o sin ión hierro en complejo y las muteínas seleccionadas frente a Pvd III succinilo biotinilada y cargada con hierro se unieron con afinidad similar a Pvd III succinilo, -succinamida, - α -cetoglutarilo con o sin ión hierro en complejo. La mayor parte de las muteínas seleccionadas se unieron con afinidad comparable a todos los subtipos del grupo respectivo con o sin ión hierro en complejo.

La selección frente a pioquelina biotinilada no cargada con hierro resultó en muteínas de lipocalina que se unían preferiblemente a pioquelina no cargada con hierro, tal como las muteínas de lipocalina SEQ ID NO: 56 y 57 que se unieron con dos a tres dígitos nM de afinidad a Pch cargada con hierro y con afinidad baja o ninguna a todas las Pch no cargadas con hierro, y en las muteínas de lipocalina tales como SEQ ID NO: 55 que se unían preferiblemente a pioquelina cargada con hierro.

La optimización de la afinidad de SEQ ID NO: 56 resultó en muteínas de lipocalina que se unían con afinidad mejorada a Pch no cargada con hierro y todavía sin afinidad o afinidad baja

a Pch cargada con hierro, mientras la optimización de la afinidad de SEQ ID NO: 55 resultó en muteínas de lipocalina que se unían con más de 75 veces de afinidad mejorada a Pch no cargada con hierro pero también con un único dígito nM de afinidad a Pch cargada con hierro.

- 5 Así, con la selección de muteínas de lipocalina y la optimización, se consiguió que sólo cuatro muteínas diferentes sean suficientes para unir todos los 10 subtipos de sideróforos de *P. aeruginosa* con y sin ión hierro en complejo (Pvd I s, sa, α KG +/- Fe; Pvd II s, sa, α KG +/- Fe; Pvd III s, sa, α KG +/- Fe; Pch +/- Fe).

- 10 Tabla 1A: Unión de muteínas al sideróforo de *P. aeruginosa* pioverdina I succinilo, succinamida, α -cetoglutarilo +/- Fe³⁺ en disolución.

	ELISA de unión en disolución CI50: nM					
	Pvd I s (+Fe)	Pvd I sa (+Fe)	Pvd I aKG (+Fe)	Pvd I s (- Fe)	Pvd I sa (-Fe)	Pvd I aKG (-Fe)
SEQ ID NO: 2	24	19	13	26	19	13
SEQ ID NO: 4	97	43	91	57	28	50
SEQ ID NO: 5	97	49	73	57	32	42
SEQ ID NO: 6	44	30	37	48	31	36
SEQ ID NO: 7	173	126	59	290	129	53
SEQ ID NO: 8	2,38	1,33	2,15	2,3	0,98	1,8
SEQ ID NO: 9	3,3	1,37	2,4	3,7	1,6	2,9
SEQ ID NO: 10	3,4	1,1	2,87	3,8	0,92	2,9
SEQ ID NO: 11	2,97	1,9	2,57	4	2	3,1
SEQ ID NO: 12	6,8	4,7	6,4	6,9	4,8	5,6
SEQ ID NO: 13	0,5	0,27	0,37	0,36	0,2	0,24
SEQ ID NO: 14	2,4	1,7	3,1	2,4	1,1	2,2
SEQ ID NO: 15	1,1	0,59	1,2	0,86	0,42	0,69
SEQ ID NO: 16	1,3	0,84	1,6	1	0,63	0,83
SEQ ID NO: 18	5,3	2,2	3,9	2,8	1,8	2,5

Tabla 1B: Unión de muteínas al sideróforo de *P. aeruginosa* soluble pioverdina II succinilo, succinamida, α -cetoglutarilo +/- Fe³⁺ en disolución.

	ELISA de unión en disolución CI50: nM					
	Pvd II s (+ Fe)	Pvd II sa (+Fe)	Pvd II aKG (+Fe)	Pvd II s (- Fe)	Pvd II sa (-Fe)	Pvd II aKG (-Fe)
SEQ ID NO: 19	30	36	21	23	42	34
SEQ ID NO: 20	48	40	85	63	40	89
SEQ ID NO: 26	0,34	0,39	1,3	0,45	0,45	0,75
SEQ ID NO: 27	0,78	1,53	1,97	1,02	1,12	1,4
SEQ ID NO: 28	0,91	1,75	2,25	1,14	1,5	1,65

SEQ ID NO: 29	0,68	1,5	1,9	0,95	1,2	1,6
SEQ ID NO: 30	0,29	0,53	3	0,4	0,3	2,85
SEQ ID NO: 31	0,29	0,29	1,1	0,38	0,35	0,64
SEQ ID NO: 32	0,27	0,32	1,25	0,42	0,37	0,72
SEQ ID NO: 33	0,28	0,32	1,3	0,4	0,32	0,7
SEQ ID NO: 34	0,29	0,32	1,6	0,27	0,32	1,2
SEQ ID NO: 35	0,33	0,39	0,76	0,34	0,42	0,99
SEQ ID NO: 36	0,33	0,39	0,76	0,34	0,42	0,99
SEQ ID NO: 37	0,19	0,28	2,1	0,2	0,3	1,4

Tabla 1C: Unión de muteínas al sideróforo de *P. aeruginosa* pioverdina III succinilo, succinamida, α -cetoglutarilo +/- Fe³⁺ en disolución.

	ELISA de unión en disolución CI50: nM					
	Pvd III s (+ Fe)	Pvd III sa (+Fe)	Pvd III aKG (+Fe)	Pvd III s (- Fe)	Pvd III sa (-Fe)	Pvd III aKG (-Fe)
SEQ ID NO: 39	146	147	23	95	94	23
SEQ ID NO: 42	35	15	78	25	7,2	69
SEQ ID NO: 43	0,31	0,25	1,4	0,6	0,46	1,90
SEQ ID NO: 44	0,35	0,26	0,93	0,35	0,21	1,10
SEQ ID NO: 45	0,75	0,43	1,50	0,41	0,46	1,70
SEQ ID NO: 46	0,69	0,30	1,02	0,44	0,30	1,20
SEQ ID NO: 47	0,37	0,30	0,82	0,17	0,28	0,58
SEQ ID NO: 48	0,28	0,22	0,95	0,29	0,24	0,64
SEQ ID NO: 49	0,32	0,27	0,79	0,21	0,27	0,62
SEQ ID NO: 50	0,29	0,35	0,95	0,29	0,37	0,82
SEQ ID NO: 51	0,37	0,37	0,97	0,35	0,34	1,1
SEQ ID NO: 52	0,32	0,31	1	0,31	0,31	1
SEQ ID NO: 53	0,21	0,25	0,54	0,19	0,63	0,33

5 Tabla 1D: Unión de muteínas al sideróforo de *P. aeruginosa* pioquelina +/- Fe³⁺ en disolución.

	ELISA de unión en disolución CI50: nM	
	pch (+Fe)	Pch (-Fe)
SEQ ID NO: 55	361	N/A
SEQ ID NO: 56	N/A	51
SEQ ID NO: 57	N/A	147
SEQ ID NO: 58	N/A	10
SEQ ID NO: 59	N/A	11
SEQ ID NO: 60	8,6	45
SEQ ID NO: 61	5,1	42
SEQ ID NO: 62	4,7	26
SEQ ID NO: 63	5,6	26

Para la clasificación de afinidad de alto rendimiento, se usó el mismo ensayo, sin embargo, con menos concentraciones diferentes de ligando.

Ejemplo 6: Afinidad de la unión de las muteínas a los sideróforos de *P. aeruginosa* determinada en Biacore

En un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (SPR) se usó un instrumento Biacore T200 (GE Healthcare) para medir la afinidad de unión de las muteínas a pioverdina I succinilo, -succinamida, - α -cetoglutarilo con ión hierro en complejo o a pioverdina II succinilo, -succinamida, - α -cetoglutarilo con ión hierro en complejo o a pioverdina III succinilo, -succinamida, - α -cetoglutarilo con ión hierro en complejo. Las muteínas seleccionadas para unión a pioverdinas y el control negativo (SEQ ID NO: 64) se biotinilaron durante 2 h a temperatura ambiente aplicando un exceso apropiado de EZ-Link NHS-PEG4-Biotina (Thermo, Cat# 21329) seguido de separación de la biotina que no ha reaccionado usando una placa desaladora Zeba Spin (Thermo, Cat# 21329) según las instrucciones del fabricante.

En el ensayo de afinidad SPR, las muteínas biotiniladas y el control negativo se capturaron en un chip sensor CAP usando el kit de captura de biotina (GE Healthcare): El chip sensor CAP se pre-inmoviliza con un oligo ADNss. El reactivo de captura de biotina no diluido (conjugado con estreptavidina con el oligo ADNss complementario) se aplicó a una velocidad de flujo de 2 μ l/min durante 300 s. Posteriormente, se aplicaron 1 μ g/ml a 100 μ g/mL de las muteínas biotiniladas o control negativo durante 300 s a una velocidad de flujo de 5 μ l/min. El canal de referencia se cargó sólo con reactivo de captura de biotina.

Para determinar la afinidad de unión, se prepararon cuatro a cinco diluciones de los representantes respectivos de Pvd (Pvd I, II, III, incluyendo -succinilo, -succinamida, - α -cetoglutarilo +Fe) a una concentración en el intervalo de 5 - 2.000 nM en tampón HBS-EP+ (GE Healthcare) y se aplicaron a la superficie del chip preparada. Aplicando una velocidad de flujo de 30 μ l/min, se usó una estrategia de cinética de único ciclo o múltiples ciclos con un tiempo de contacto de la muestra de 120 - 180 s y un tiempo de disociación de 900 - 2400 s. La ausencia de unión al control negativo SEQ ID NO: 64 se confirmó usando una alta concentración (por ejemplo, 1.200 nM) de la Pvd respectiva. Después de la inmovilización del ligando, para el análisis usando cinética de único ciclo, todas las 4 - 5 concentraciones de Pvd se aplicaron consecutivamente en orden ascendente antes de monitorizar la disociación. Para el análisis usando cinética de múltiples ciclos, se aplicaron 4 diluciones de Pvd cada una seguida de una fase de disociación. Todas las medidas se realizaron a 25°C. La regeneración de la superficie del chip sensor CAP se consiguió con una inyección de 6 M Gua-HCl con 0,25 M NaOH seguido de un lavado extra con tampón de operación y un periodo de

estabilización de 120 s. Los datos se evaluaron con software Biacore T200 Evaluation (V 1.0). Se usó una referencia doble. Se usó un modelo de unión 1:1 para ajustar los datos brutos.

Las constantes cinéticas resultantes para una selección de muteínas de lipocalina se resumen en las Tablas 2A-C. Las muteínas de lipocalina pudieron generarse para cada grupo de Pvd uniéndose en el intervalo subnM a nM bajo de un único dígito a todos los subtipos del grupo respectivo de Pvd. El ligando natural de hNGAL de tipo salvaje, Fe-enterobactina, sin embargo, no se une por las muteínas de lipocalina específicas de Pvd.

10 Tabla 2A: Constantes cinéticas de muteínas de lipocalina específicas de Pvd I para Pvd I succinilo, - succinamida, y- α -cetoglutarilo en complejo con Fe³⁺.

	Pvd I s (+ Fe)			Pvd I sa (+Fe)			Pvd I k (+Fe)			Fe-Enterobactina
SEQ ID	k _{asoc} [1/Ms]	k _{disoc} [1/s]	K _D [nM]	k _{asoc} [1/Ms]	k _{disoc} [1/s]	K _D [nM]	k _{asoc} [1/Ms]	k _{disoc} [1/s]	K _D [nM]	K _D [nM]
SEQ ID NO: 8	5,37E+04	1,79E-04	3,33	1,11E+05	1,20E-04	1,08	4,74E+04	2,35E-04	4,95	no bdg.
SEQ ID NO: 9	3,31E+04	3,30E-04	9,97	8,02E+04	2,57E-04	3,20	3,80E+04	5,32E-04	14,03	no bdg.
SEQ ID NO: 10	3,47E+04	4,78E-04	13,78	8,63E+04	3,04E-04	3,52	5,02E+04	6,31E-04	12,57	no bdg.
SEQ ID NO: 11	2,84E+04	4,04E-04	14,22	6,76E+04	2,97E-04	4,40	3,48E+04	5,86E-04	16,84	no bdg.
SEQ ID NO: 13	1,17E+05	6,15E-05	0,53	1,65E+05	4,24E-05	0,26	9,51E+04	8,37E-05	0,88	no bdg.
SEQ ID NO: 16	3,56E+04	1,88E-04	5,28	5,43E+04	1,56E-04	2,87	3,14E+04	2,54E-04	8,10	no bdg.

15 Tabla 2B: Constantes cinéticas de muteínas de lipocalina específicas de Pvd II para Pvd II succinilo, - succinamida, y- α -cetoglutarilo en complejo con Fe³⁺.

	Pvd II s (+ Fe)			Pvd II sa (+Fe)			Pvd II k (+Fe)			Fe-Enterobactina
SEQ ID	k _{asoc} [1/Ms]	k _{disoc} [1/s]	K _D [nM]	k _{asoc} [1/Ms]	k _{disoc} [1/s]	K _D [nM]	k _{asoc} [1/Ms]	k _{disoc} [1/s]	K _D [nM]	K _D [nM]
SEQ ID NO: 32	1,15E+06	1,09E-03	0,94	1,37E+06	9,55E-04	0,7	1,09E+05	3,74E-04	3,44	no bdg.
SEQ ID NO: 33	1,23E+06	1,25E-03	1,02	1,41E+06	1,04E-03	0,74	9,93E+04	4,16E-04	4,19	no bdg.
SEQ ID NO: 35	1,31E+05	4,59E-05	0,35	2,48E+05	4,58E-05	0,18	4,35E+04	1,49E-04	3,42	no bdg.
SEQ ID NO: 36	1,10E+05	4,30E-05	0,39	1,38E+05	3,67E-05	0,27	2,86E+04	5,62E-05	1,97	no bdg.

Tabla 2C: Constantes cinéticas de muteínas de lipocalina específicas de Pvd III para Pvd III succinilo, - succinamida, y- α -cetoglutarilo en complejo con Fe³⁺.

	Pvd III s (+ Fe)			Pvd III sa (+Fe)			Pvd III k (+Fe)			Fe-Enterobactina
SEQ ID	k_{asoc} [1/Ms]	k_{disoc} [1/s]	K_D [nM]	k_{asoc} [1/Ms]	k_{disoc} [1/s]	K_D [nM]	k_{asoc} [1/Ms]	k_{disoc} [1/s]	K_D [nM]	K_D [nM]
SEQ ID NO: 43	7,05E+04	1,58E-04	2,24	3,52E+04	1,07E-04	3,04	5,73E+04	3,03E-04	5,29	n.d.
SEQ ID NO: 44	5,62E+04	1,42E-04	2,53	3,03E+04	8,90E-05	2,94	4,82E+04	2,71E-04	5,64	n.d.
SEQ ID NO: 45	5,90E+04	1,59E-04	2,70	3,27E+04	9,91E-05	3,03	4,73E+04	3,30E-04	6,99	n.d.
SEQ ID NO: 46	8,32E+04	1,66E-04	2,00	4,36E+04	6,90E-05	1,58	7,67E+04	2,41E-04	3,15	n.d.
SEQ ID NO: 47	7,89E+04	7,91E-05	1,00	1,28E+05	2,52E-05	0,20	2,92E+04	2,62E-04	8,97	n.d.
SEQ ID NO: 48	6,70E+04	1,06E-04	1,58	1,48E+05	9,51E-05	0,64	2,72E+04	1,58E-04	5,81	n.d.
SEQ ID NO: 49	6,88E+04	1,05E-04	1,52	1,34E+05	1,12E-04	0,84	2,81E+04	4,29E-05	1,53	n.d.
SEQ ID NO: 53	5,10E+04	4,19E-05	0,82	6,73E+04	3,90E-05	0,58	3,88E+04	1,40E-04	3,60	no bdg.

Además, la ausencia de unión a varios sideróforos que no pertenecen al subgrupo de pioverdina respectivo (I, II, III) y a MMP-9 se confirmó usando el ensayo descrito anteriormente aplicando altas concentraciones ($\geq 1 \mu\text{M}$) de los analitos siguientes a la muteína inmovilizada:

- 5 Fe-enterobactina, desferoxamina, pioquelina, pioverdinas de los demás subgrupos respectivos, MMP-9 proforma y MMP-9 activado. Una visión global de este análisis se proporciona en la Tabla 3.

10 Para la determinación de las constantes cinéticas y K_D resultante para la interacción de la muteína SEQ ID NO: 62 con Pch +Fe la muteína o el control negativo SEQ ID NO: 64 se inmovilizó en la superficie de un chip CM5 usando química de amina estándar: La superficie del chip se activó usando EDC y NHS. Posteriormente, se aplicaron 5 $\mu\text{g/mL}$ de muteína o la disolución de control negativo en 10 mM acetato pH 4,0 a una velocidad de flujo de 10 $\mu\text{L/min}$ hasta que se consiguió un alto nivel de inmovilización de aproximadamente 2.000 RU. Los

15 grupos activados residuales se apantallaron con etanolamina. Los canales de referencia se trataron con EDC/NHS seguido de etanolamina (inmovilización de blanco).

Para determinar la afinidad, se prepararon cinco diluciones de pioquelina (+Fe), en tampón HBS-P+ y se aplicaron a la superficie del chip preparada. El ensayo de unión se llevó a cabo

20 con un tiempo de contacto de 180 s, tiempos de disociación de 1.200 - 1.800 s y aplicando una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{L/min}$. Las medidas se realizaron a 25°C. La regeneración de la superficie de la muteína inmovilizada se consiguió por tres inyecciones consecutivas de 10 mM Gly-HCl pH 1,5 (120 s) seguido de un lavado extra con tampón de operación y un periodo de estabilización. Los datos se evaluaron con software Biacore T200 Evaluation (V 1.0). Se usó

25 una referencia doble. Se usó el modelo de unión 1:1 para ajustar los datos brutos.

La constante cinética resultante para SEQ ID NO: 62 se muestra en la Tabla 2D.

Usando el mismo ensayo, la ausencia de unión a los sideróforos diferentes de pioquelina y a

30 MMP-9 se confirmó aplicando altas concentraciones ($\geq 1 \mu\text{M}$) de los analitos siguientes a la muteína inmovilizada SEQ ID NO: 62: Fe-enterobactina, desferoxamina, pioverdina, MMP-9

proforma y MMP-9 activado. Una visión global de los resultados se muestra en la Tabla 3.

Tabla 2D: Constantes cinéticas de la muteína de lipocalina específica de pioquelina SEQ ID NO: 62 a pioquelina en complejo con Fe^{3+} .

	pch (+Fe)		
SEQ ID	k_{asoc} [1/Ms]	k_{disoc} [1/s]	K_D [nM]
SEQ ID NO: 62	2,25E+06	6,43E-04	0,29

5

Tabla 3: Especificidad de unión de las muteínas de lipocalina para Pvd I, Pvd II, Pvd III o pioquelina.

	Pvd I s (+Fe)	Pvd II s (+Fe)	Pvd III s (+ Fe)	pch (+Fe)	Entero- bactina (+Fe)	Desferox- amina	MMP-9 proforma	MMP-9 activado
SEQ ID NO: 16	+	-	-	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 36	-	+	-	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 53	-	-	+	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 62	-	-	-	+	-	-	-	-
SEQ ID NO: 64	-	-	-	-	+	-	-	-

10 Ejemplo 7: Ensayo funcional de la unión de muteínas a sideróforos de *P. aeruginosa*; Inhibición de la captación de hierro

Para determinar la inhibición de la captación de hierro funcional en bacterias vivas, se incubaba un intervalo de concentración de dosis de las muteínas de lipocalina que se unen a sideróforo de *P. aeruginosa* durante 1 hora con 100 nM de sideróforo cargado con hierro radiactivo en un tampón Tris.HCl 50 mM pH 8,0 antes de incubar durante 30 minutos con bacterias a una concentración final de $\text{DO}=1$ a 595 nm en una placa de 96 pocillos. Posteriormente, las bacterias se filtran con un recolector celular a través de un filtro GF/B de placa de 96 pocillos preincubado con una disolución de poli etilen imina al 5% y lavado 3 veces con tampón Tris. Después de filtrar y secar, se añaden 30 μl de mezcla de centelleo en cada pocillo de filtro antes de contar. El sideróforo pioverdina cargado con hierro se incubaba durante 15 minutos con $^{55}\text{Fe-Cl}_3$ en tampón Tris con una proporción 4 a 1 de pioverdina y hierro en una disolución final 200 μM . Para cargar pioquelina con hierro radiactivo, se añaden 40 μl de disolución de $^{55}\text{FeCl}_3$ a 0,25 mM en HCl 0,5 N a una disolución de metanol de pioquelina a 1 mM. Después de un tiempo de incubación de 15 minutos, se añaden 940 μl de Tris HCl 50 mM pH 8,0 para obtener una disolución 20 μM de $^{55}\text{Fe-Pch}$ con una proporción 2 a 1 entre pioquelina y hierro. Las

bacterias se preparan como sigue: 10 ml de un cultivo de toda la noche en medio Mueller Hinton inoculado con un clon aislado se centrifuga y el sedimento lavado se resuspende en 25 ml de medio succinato y se incuba con agitación durante 2 horas. En paralelo, se inoculan 20 ml de medio Mueller Hinton con 5 ml del cultivo de toda la noche y se incuba con agitación durante 2 horas para usarse como el nivel de captación de hierro basal. Los cultivos de bacterias de 25 ml se centrifugan y se lavan con el medio correspondiente antes de que el sedimento se resuspenda en tampón Tris.HCL 50 mM pH8,0 y se mida la DO a 595 nm para tener una concentración final en el ensayo de DO = 1.

Se calcula el porcentaje de incorporación para cada punto de concentración y se calcula la inhibición con software propio. Para este cálculo, el nivel máximo de captación de hierro se basa en el valor obtenido en medio Succinato Mínimo sin ninguna muteína de lipocalina, y el valor basal se obtiene en el medio Mueller Hinton rico donde no se expresa el receptor del sideróforo.

Tabla 4: Las muteínas de lipocalina bloquean la captación de hierro de *P. aeruginosa* como se muestra de forma ejemplar para las muteínas de lipocalina SEQ ID NO: 16, 37, 53 y 62.

SEQ ID	Captación de hierro CI50: nM			
SEQ ID NO: 16	Pvd I s	Pvd I sa	Pvd I aKG	
	121	123	183	
SEQ ID NO: 37	Pvd II s	Pvd II sa	Pvd II aKG	
	118	107	51	
SEQ ID NO: 53	Pvd III s	Pvd III sa	Pvd III aKG	
	74	32	8	
SEQ ID NO: 62				Pch
				54

Ejemplo 8: Ensayo funcional de la unión de muteínas a sideróforos de *P. aeruginosa*; Inhibición del crecimiento

La inhibición del crecimiento bacteriano se determina incubando las muteínas que se unen a sideróforos de *P. aeruginosa* en el medio succinato tratado con Chelex complementado con una disolución de elemento traza y 0,1 mg/ml BSA con un cultivo bacteriano en MS diluido a una DO final de 0,05 a 595 nm en una placa negra de 96 pocillos con fondo transparente. La placa se incuba toda la noche a 37°C con agitación cada 20 minutos y lectura de DO a 595 nm en un lector IEMS MF de Thermo Labsystem. La inhibición del crecimiento se muestra de forma ejemplar para una cepa de Pvd I y muteína específica de Pvd I SEQ ID NO: 16 en la Figura 4A, para una cepa de Pvd II y muteína específica de Pvd II SEQ ID NO: 19, y SEQ ID NO: 36 en la Figura 4B, para una cepa de Pvd III y muteína específica de Pvd III SEQ ID NO: 53 en la Figura

4C y para una cepa con Pvd I inactivada ($\Delta pvdA$) que se basa en pioquelina para la captación de hierro para crecer y muteína específica de pioquelina SEQ ID NO: 62 en la Figura 4D. El control es crecimiento bacteriano sin muteína de lipocalina.

5 Ejemplo 9: Evaluación de la estabilidad de las muteínas

Para determinar las temperaturas de fusión como un indicador general para la estabilidad global, las muteínas específicas de sideróforo (SEQ ID NOs: 13 - 18; 26, 31 – 36; 47 – 53; 58 - 62) a una concentración de proteína de 1 mg/ml en PBS (Gibco) se escanearon (25-100°C) a 10 1°C/min usando un instrumento nanoDSC capilar (CSC 6300, TA Instruments). La temperatura de fusión (T_m) se calculó a partir del termograma presentado usando el software integrado Nano Analyze.

Las temperaturas de fusión resultantes así como el inicio de la fusión de las muteínas de lipocalina (SEQ ID NOs: 13 - 18; 26, 31 – 36; 47 – 53; 58 - 62) se listan en las Tablas 5A-D 15 siguientes. Para todos los grupos de Pvd así como para muteínas de lipocalina pch con T_m s en el intervalo de 70°C, podría seleccionarse la mejor muteína de lipocalina para tipo de Pvd y pch que varía de 68 a 74°C, indicando una buena estabilidad de las moléculas.

Tabla 5A: T_m e inicio de la fusión según se determina por nanoDSC de muteínas de lipocalina 20 específicas de Pvd I.

SEQ ID	nanoDSC	
	T_m °C	inicio
SEQ ID NO: 13	59	51
SEQ ID NO: 14	61	51
SEQ ID NO: 15	68	59
SEQ ID NO: 16	69	60
SEQ ID NO: 17	61	53
SEQ ID NO: 18	61	54

Tabla 5B: T_m e inicio de la fusión según se determina por nanoDSC de muteínas de lipocalina específicas de Pvd II.

SEQ ID	nanoDSC	
	T_m °C	inicio
SEQ ID NO: 26	65	58
SEQ ID NO: 67	67	60

31		
SEQ ID NO: 32	64	56
SEQ ID NO: 33	67	61
SEQ ID NO: 34	67	56
SEQ ID NO: 35	71	63
SEQ ID NO: 36	70	61

Tabla 5C: T_m e inicio de la fusión según se determina por nanoDSC de muteínas de lipocalina específicas de Pvd III.

	nanoDSC	
SEQ ID	T _m °C	inicio
SEQ ID NO: 47	62	53
SEQ ID NO: 48	64	55
SEQ ID NO: 49	59	50
SEQ ID NO: 50	61	52
SEQ ID NO: 51	62	53
SEQ ID NO: 52	59	49
SEQ ID NO: 53	68	59

- 5 Tabla 5D: T_m e inicio de la fusión según se determina por nanoDSC de muteínas de lipocalina específicas de pch.

	nanoDSC	
SEQ ID	T _m °C	inicio
SEQ ID NO: 58	63	51
SEQ ID NO: 59	60	54
SEQ ID NO: 60	68	56
SEQ ID NO: 61	69	63
SEQ ID NO: 62	74	63

Para evaluar la estabilidad en el almacenamiento y a congelación/descongelación se incubaron

las muteínas a una conc. de 1 mg/ml en PBS durante 1 semana a 37°C o se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación. La muteína activa se midió en un marco de ELISA cuantitativo. La proteína monomérica se midió en una cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Los datos ejemplares para SEQ ID NO: 16, 36, 53, 62 se muestran en la Tabla 6.

5

Para ensayar la actividad de la proteína se aplicó el ELISA siguiente: Una placa de 384 pocillos adecuada para medidas de fluorescencia (Greiner FLUOTRAC™ 600, fondo plano negro, alta unión) se recubrió con 20 µl de Neutravidina (Thermo Scientific) a una concentración de 5 µg/ml en PBS toda la noche a 4°C. Después de lavar, los pocillos recubiertos con Neutravidina se bloquearon con 100 µl de tampón de bloqueo (2% p/v BSA en PBS que contenía 0,1% v/v Tween-20) durante 1h. Después de lavar de nuevo, se añadieron 20 µl de pioverdina I succinilo, pioverdina II succinilo, pioverdina III succinilo biotiniladas y cargadas con hierro o pioquelina biotinilada a una concentración de 1 µg/ml en tampón de bloqueo. La placa se lavó y se transfirieron 20 µl del estándar de proteína apropiadamente diluido, muestra de referencia sin estresar o muestra estresada a la placa ELISA y se incubó. Para cuantificar la proteína unida a la placa, la placa de ELISA se lavó, los sobrenadantes residuales se desecharon y se añadieron 20 µl de anticuerpo anti-hNGAL marcado con HRP a una concentración óptima predeterminada en tampón de bloqueo y se incubó. Después de lavar, se añadieron 20 µl de sustrato de HRP fluorogénico (QuantaBlu, Pierce) a cada pocillo, y la reacción se dejó proceder durante 20--30 minutos. La intensidad de fluorescencia de cada pocillo en la placa se leyó usando un lector de fluorescencia en microplacas (Tecan).

A no ser que se indique otra cosa, todas las etapas de incubación se realizaron durante 1h a temperatura ambiente y después de cada etapa de incubación la placa se lavó con 100 µl de tampón PBS-T (PBS, 0,05 % Tween 20) cinco veces usando un lavador Biotek ELx405 select CW.

Para el ELISA descrito anteriormente, se preparó una curva de calibración incluyendo 11 diluciones que variaron típicamente de 0,008 – 500 ng/mL y se prepararon tres diluciones diferentes independientes en el intervalo lineal de la curva de calibración para cada muestra. Se usó tampón de bloqueo suplementado opcionalmente con 1% de plasma humano o murino para las diluciones.

La curva de calibración se ajustó usando un modelo de regresión no lineal logístico de 4 parámetros (4PL) y se usó para calcular las concentraciones de proteína activa para las muestras ensayadas. Las concentraciones de proteína activa determinadas se referenciaron frente a una muestra no estresada almacenada a la misma concentración en la misma matriz.

La cromatografía de exclusión por tamaño analítica se realizó en un sistema de HPLC Agilent con dos columnas Superdex 75 5/150 GL (GE Healthcare) en línea usando PBS (Gibco) como un eluyente a una velocidad de flujo de 0,3 mL/min.

- 5 Para evaluar la estabilidad en el almacenamiento en plasma, se incubaron las muteínas a una conc. de 0,5 mg/ml durante 1 semana a 37°C en plasma humano, de ratón y de rata. La muteína activa se midió en un marco de ELISA cuantitativo como se describe.

10 Todas las muteínas de lipocalina ensayadas demostraron ser estables en todas las condiciones ensayadas.

15 Tabla 6: Estabilidad después de 3 ciclos de congelación/descongelación (F/T); 1 semana de almacenamiento en PBS a 37°C y 1 semana de almacenamiento en plasma humano (hu), de ratón (mu) o rata evaluada por recuperación de la actividad en qELISA y contenido en monómero en SEC analítica: estable en qELISA = 100 +/- 15 %; estable en aSEC = 100 +/- 5% (recuperación del área del pico del monómero comparado con la muestra de referencia no estresada); para todas las muestras incluyendo las referencias se ha detectado un contenido de monómero de 100 por ciento de área.

		3xF/T, -20° 1mg/ml		1 semana PBS, 37°C, 1 mg/ml		1 semana plasma hu, 37°C	1 semana plasma mu, 37°C	1 semana plasma de rata, 37°C
Muteína	sideróforo	% recuperación de actividad en qELISA	% monómero en SEC	% recuperación de actividad en qELISA	% monómero en SEC	% recuperación de actividad en qELISA		
SEQ ID NO: 16	Pvd I	102	98	86	98	86	100	100
SEQ ID NO: 36	Pvd II	99	101	104	98	93	91	110
SEQ ID NO: 53	Pvd II	98	99	107	102	92	83	101
SEQ ID NO: 63	pch	107	100	95	104	97	102	95

20 Ejemplo 10: Potencia *in vivo* de las muteínas de lipocalina en modelo de ratón

Se estudió el efecto profiláctico de SEQ ID NO: 19 después de administración intravenosa (i.v.) en una infección pulmonar inducida por *P. aeruginosa* en ratones.

25 SEQ ID NO: 19 se administró 1 hora antes de la infección y en el momento de la infección. La carga bacteriana pulmonar se evaluó 24 h después de la infección.

La cepa usada en este estudio fue *P. aeruginosa* (ATCC27853). Empezando a partir de *P. aeruginosa* almacenada a -80°C en PBS/ 15% Glicerol, se llevó a cabo un cultivo de toda la noche a 37°C con agitación en caldo Mueller-Hinton, y seguido de subcultivo adicional (100µl de cultivo de toda la noche + 100ml de MHB) hasta el final de la fase logarítmica de crecimiento. El cultivo se lavó dos veces y se resuspendió en disolución salina tamponada con fosfato antes de congelarlo a 1E+09 CFU/ml. Para cada experimento, se descongeló un vial fresco y el inóculo se verificó por recuentos viables.

Se dejaron ratones macho Swiss de 7 a 8 semanas de edad (5 animales/grupo) adquiridos en Janvier laboratories, (Route des chênes secs, 53940 Le Genest Saint Ile, Francia), al menos 5 días de aclimatización antes del uso. Los animales se mantuvieron a temperatura de 22±2°C con humedad relativa de 40 – 70 % y 12-15 cambios de aire fresco/hora. Ciclo de luz 12/12 horas: luz 7 a.m. a 7 p.m. (ciclo normal). Las derivaciones de temperatura y humedad relativa se registraron continuamente. Los animales se estabularon 5 por jaula y se les dejó acceso a agua y dieta estándar (dieta estándar AO4 C (SAFE)) ad libitum. Todos los experimentos se realizaron con la aprobación del comité ético de Sanofi R&D (CEPAL).

La infección pulmonar se indujo por pulso intranasal de ratones macho Swiss con 1.E+07 CFU/ratón de *P.aeruginosa* en 50µl de NaCl 0,9%.

SEQ ID NO: 19 a concentraciones de 200, 400, 1.000 ó 2.000µg/ratón se administró 1 h antes de la infección y en el momento de la infección, con bolo i.v..

Veinticuatro horas después de la infección, los animales se sacrificaron por eutanasia y se determinó el recuento bacteriano de homogenados de pulmón y se expresó en log10 CFU/ml como media ± sem.

El análisis estadístico se realizó usando SAS v9.2. Se usó software Excel 2003 para las presentaciones de las figuras. Las comparaciones en dosis de SEQ ID NO: 19 frente a vehículo se evaluaron con un análisis de varianza de una vía seguido de ensayo de Dunnett (ZAR J.H., « Biostatistical Analysis », Prentice Hall International Editions, 4a edición, 1999.; C.W. Dunnett, "A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control", J. Amer. Statist. Assoc., 50 (1955), p. 1096–1121, 1955).

En un modelo de infección pulmonar inducida por *P.aeruginosa* en ratones, SEQ ID NO: 19 se administró 1 hora antes y en el momento del pulso bacteriano y SEQ ID NO: 19 previno el desarrollo de infección en ratones de una manera dependiente de la dosis. Se observó un efecto de prevención significativo para SEQ ID NO: 19 empezando a 200µg/ratón, con un

efecto máximo a 2.000µg/ratón.

Ejemplo 11: Cristalización

- 5 Para determinar la estructura tridimensional de la proteína SEQ ID NO: 31 en complejo con Pvd-Fe se aplicó el procedimiento siguiente.

La secuencia de proteína presentada en la Figura 6 se clonó en el plásmido pET-24a y se expresó como una construcción con sitio de reconocimiento de proteasa TEV etiquetada con
10 6His en el extremo N terminal.

El plásmido se usó para transformar células de *E. coli* BL21(DE3) Star y los clones resultantes se inocularon en medio Overnight Express Instant TB (Novagen) y las células se recogieron después de 47 horas de incubación a 18°C con agitación a 200 RPM a una DO600 final de 4,7.
15 El sedimento celular se resuspendió en tampón que contenía 500mM NaCl, 10mM Imidazol, 1mM MgCl₂, 1mM TCEP, 5% glicerol y 20mM Tris pH 7,4 y se lisó por un procedimiento de ultra-sonicación estándar. El extracto resultante se aclaró por centrifugación a baja velocidad y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 22 nm antes de cargarlo en una columna Ni NTA (Qiagen) de 5 ml pre-equilibrada con tampón 100 mM NaCl, 10mM Imidazol,
20 100 mM HEPES pH 8. La proteína se eluyó con gradiente lineal de imidazol 10mM a 300mM y se dializó adicionalmente toda la noche con tampón 100 mM NaCl, 10mM Imidazol, 100 mM HEPES pH,8. La proteína se concentró hasta 20 mg/ml y se cargó en una columna de filtración en gel Superdex 75 (GE). La proteína resultante se dializó con tampón 100 mM NaCl, 10 mM HEPES pH 8 toda la noche en presencia de proteasa TEV (proporción 1/50) para eliminar la
25 etiqueta 6His N-terminal seguido de una etapa de purificación negativa Ni NTA como se ha descrito anteriormente para separar la proteína escindida. La proteína final se concentró hasta 12 mg/ml en 100 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 se alicuotó, se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C para uso posterior.

30 Para la cristalización, la proteína se incubó con una concentración molar 10 x veces superior de Pvd-Fe toda la noche y se plaqueó para cribado de cristalización realizado en placas de formato SBS en las que se mezclaron 100 nL de gotas de proteína con 100nL de disolución de cribado de cristalización en experimentos con formato de formación de gotas por difusión de vapor a 20°C y 4°C. Se detectaron varios éxitos de cristalización y las condiciones de
35 cristalización se optimizaron adicionalmente con el fin de obtener cristales con una buena calidad de difracción de rayos X.

La calidad de difracción de los cristales se evaluó usando una fuente de rayos X sincrotrón y

los cristales que mejor difractaron se obtuvieron bajo condiciones de 20% PEG3350 y 0,2M LiSO₄ a 20°C. Los mejores cristales se crioprotegieron incrementando la concentración de PEG3350 hasta 35% después se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se recogió un conjunto de datos 1,8Å a una temperatura de 100K.

5

Los datos de rayos X se procesaron por MOSFLM y la estructura de la proteína se determinó por el método de reemplazo molecular usando pdb 1LKE como un modelo de búsqueda y el modelo estructural se refinó adicionalmente hasta calidad Rlibre=0,233 - R=0,200 en P41212 con 2 complejos ternarios de proteína por unidad asimétrica.

10

La estructura de la proteína presenta un soporte clásico de lipocalina con Pvd-Fe unida a ambas proteínas de muteína presentes en la unidad asimétrica, Figura 7. Los residuos de aminoácidos implicados en la unión de Pvd-Fe se analizaron y se presentan en la Figura 8. Los oxígenos de la Pvd que se unen directamente a Fe se identifican y se presentan en la Figura 9.

15

Ejemplo 12: Generación de construcciones de molécula de fusión

Cuatro muteínas de lipocalina simples se fusionaron genéticamente para formar una molécula de fusión por síntesis génica (véase la Figura 10A). Las muteínas de lipocalina se separaron una de otra por conectores como (G4S)₂, se eliminaron los sitios potenciales de N-glicosilación (N-X-S/T), y las construcciones resultantes se subclonaron posteriormente en el vector de expresión episomal pXL, un análogo del vector pTT descrito por Durocher et al. (2002), Nucl. Acids Res. 30(2). La molécula de fusión de SEQ ID NO: 134 se generó por fusión genética de las muteínas de lipocalina de SEQ ID NOs: 36, 16, 53 y 62. La molécula de fusión de SEQ ID NO: 135 se generó por fusión genética de las muteínas de lipocalina de SEQ ID NOs: 34, 17, 50 y 63.

Las denominadas construcciones molécula de fusión con Fc se generaron por fusión de cuatro muteínas de lipocalina simples separadas por un conector (G4S)₂ con el dominio Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 140). SEQ ID NO: 136 se generó por fusión genética de las muteínas de lipocalina de SEQ ID NOs: 36, 16, 53 y 62 separadas por conectores (G4S)₂ con el extremo N del dominio Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 140). SEQ ID NO: 137 se generó por fusión genética de las muteínas de lipocalina de SEQ ID NOs: 34, 17, 50 y 63 separadas por conectores (G4S)₂ con el extremo N del dominio Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 140). SEQ ID NO: 138 se generó por fusión genética de las muteínas de lipocalina de SEQ ID NOs: 34, 17, 50 y 63 separadas por conectores (G4S)₂ con el extremo C del dominio Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 140). SEQ ID NO: 139 se generó por fusión genética de las muteínas de lipocalina de SEQ ID NOs: 34 y 17 separadas por un conector (G4S)₂ con el extremo N del

dominio Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 140) y las muteínas de lipocalina de SEQ ID NOs: 50 y 63 separadas por un conector (G4S)₂ con el extremo C del dominio Fc de IgG4 humana (SEQ ID NO: 140). Las estructuras globales de estas construcciones molécula de fusión con Fc se muestran en las Figuras 10B a D.

5

Las construcciones de molécula de fusión ejemplares adicionales son aquellas de SEQ ID NOs: 143 a 186.

Se indica que las referencias internas usadas para las muteínas y las construcciones de molécula de fusión en el listado de secuencias no reflejan necesariamente las mutaciones o
10 todas las mutaciones en comparación con la secuencia de referencia, es decir, la secuencia de hNGAL de tipo salvaje (por ejemplo, SEQ ID NO: 1). Las mutaciones reales pueden determinarse fácilmente comparando las secuencias de muteína/molécula de fusión con la secuencia de referencia.

15 Ejemplo 13: Expresión de las construcciones de molécula de fusión y control de calidad

Los plásmidos de expresión para transfección se propagaron en *E.coli* y se prepararon usando el Kit EndoFree Mega de Qiagen. Las moléculas de fusión se produjeron por transfección transitoria de células HEK293 creciendo en medio de expresión FreeStyle F17 de Life
20 Technologies. Las células se cultivaron a 37°C en un agitador incubador Kuehner ISF1-X a 110 rpm con 8% CO₂. Las células se retiraron seis a siete días después de la transfección por centrifugación durante 20 min a 4.500 g. Los sobrenadantes se filtraron mediante una membrana de 0,2 µm para eliminar las partículas remanentes.

25 Las proteínas con etiqueta His se purificaron por cromatografía de afinidad en columnas HisTrap de GE Healthcare. Para evitar la unión inespecífica, se añadió 20 mM imidazol antes de la etapa de captura. Las proteínas se lavaron con tampón MES (50 mM MES, 1 M NaCl, pH 6,5) y tampón Tris (50 mM Tris, 50 mM NaCl pH 8) y se eluyó con un gradiente hasta 500 mM imidazol en tampón Tris.

30

Las variantes FC se purificaron por cromatografía de afinidad en columnas de Proteína A HiTrap de GE Healthcare. Las proteínas se lavaron con tampón PBS (Life Technologies) seguido de elución con tampón 100 mM Citrato pH 3 y se neutralizaron con tampón Tris pH 9. La etapa de pulido de las proteínas etiquetadas con His y las variantes FC consistió en
35 cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando Superdex 200 (GE Healthcare) con PBS (Life Technologies). Después de concentración por ultrafiltración, las moléculas de fusión se esterilizaron por filtración (0,2 µm), se alicuotaron y se almacenaron a -80°C. La concentración de proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm.

Se hizo un control de calidad adicional por SEC analítica, SDS-PAGE (véase la Figura 11) y espectrometría de masa. La SEC analítica se realizó usando un HPLC BioSECcurity (PSS) equipado bien con un TSKgel3000SWXL (7,8x300 mm, Tosoh) con pre-columna (7,8x50 mm, Tosoh) o con una columna MabPac SEC-1 (4x300 mm, Thermo) y pre-columna MabPac SEC-1 (4x50 mm, Thermo Fisher). El análisis se hizo a 1 ml/min (para la columna TSKgel) ó 0,25 ml/min (para la columna MabPac) usando 250 mM NaCl, 100 mM Na-fosfato pH 6,7 con detección a 280 nm y 260 nm. Se aplicaron 5 µg de proteína (a 1 mg/ml en D-PBS) a la columna. Para estimar el tamaño molecular, la columna se calibró usando mezclas estándar de filtración en gel (kit de filtración en gel MWGF-1000, SIGMA Aldrich y kit de proteína, PSS). La evaluación de los datos se realizó usando software WinGPC v5.11 (PSS). Los resultados para una molécula de fusión y una construcción molécula de fusión con Fc se muestran en la Tabla 7 siguiente.

Tabla 7: Análisis de las construcciones de molécula de fusión por SEC analítica (columna TSKgel3000SWXL).

Proteína	Agregado por SEC	MW por SEC
SEQ ID NO: 134	< 1 %	125 kDa
SEQ ID NO: 136	1 %	457 kDa

Los análisis de masa precisos se realizaron usando un sistema de masa precisa 6540 UHD Q-TOF LC-MS (Agilent) equipado con una fuente iónica dual ESI. Las medidas se hicieron en modo de ión positivo con intervalo de masa prolongado (2 GHz). Las muestras se diluyeron hasta una concentración de 0,5 mg/ml en D-PBS. Para la medida de las muestras reducidas, se añadió 10 mM de TCEP. La desglicosilación en condiciones nativas se hizo con muestras a 0,5 mg/ml en D-PBS después de la adición de 250 unidades de PNGasaF (NEB) a 12,5 µg de proteína e incubación a 37°C durante 18 hrs. Se aplicaron 2 µg de proteína en una columna Poroshell 300SB-C8 (0,5x75 mm, 5 µm, Agilent) con pre-columna (Narrow bore Poroshell 300SB-C8, 2,1x12,5 mm, 5 µm, Agilent) operado a 40°C. El eluyente A fue agua LC con 0,1% de ácido fórmico; el eluyente B fue 90% acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico. La separación se consiguió con un gradiente lineal de 5% B a 100% B en 7 mins y una velocidad de flujo de 180 µl/min. El procesamiento y análisis de los datos se hicieron usando software MassHunter Qualitative Analysis versión B.06. Los resultados para una molécula de fusión y una construcción molécula de fusión con Fc se muestran en la Tabla 8 siguiente.

Tabla 8: Análisis de masa preciso de construcciones de molécula de fusión por ESI-MS.

Proteína	Masa exacta, reducida	Masa precisa, reducida	Masa Delta	Error de masa
SEQ ID NO: 134	85.234,2 Da (PyroE)	85.232,0 Da (PyroE)	2,2 Da	25 ppm
SEQ ID NO: 136	109.473,1 Da (PyroE, desglicosilada)	109.483,7 Da (PyroE, desglicosilada)	-10,5 Da	-96 ppm

Ejemplo 14: Expresión de muteínas de lipocalina simples

5

Los plásmidos de expresión para transfección se propagaron en *E.coli* y se prepararon usando el Kit EndoFree Mega de Qiagen. Las muteínas de lipocalina se produjeron por transfección transitoria de células HEK293 creciendo en medio de expresión FreeStyle F17 de Life Technologies. Las células se cultivaron a 37°C en un agitador incubador Kuehner ISF1-X a 110 rpm con 8% CO₂. Las células se retiraron seis a siete días después de la transfección por centrifugación durante 20 min a 4.500 g. Los sobrenadantes se filtraron mediante una membrana de 0,2 µm para eliminar las partículas remanentes. Las proteínas con etiqueta His se purificaron por cromatografía de afinidad en columnas HisTrap de GE Healthcare. Para evitar la unión inespecífica, se añadió 20 mM imidazol antes de la etapa de captura. Las proteínas se lavaron con tampón MES (50 mM MES, 1 M NaCl, pH 6,5) y tampón Tris (50 mM Tris, 50 mM NaCl pH 8) y se eluyó con un gradiente hasta 500 mM imidazol en tampón Tris. La etapa de pulido consistió en cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando Superdex 75 (GE Healthcare) con PBS (Life Technologies). Después de concentración por ultrafiltración, las proteínas se esterilizaron por filtración (0,2 µm), se alicuotaron y se almacenaron a -80°C. La concentración de proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm. Se hizo un control de calidad adicional por SEC analítica, SDS-PAGE y espectrometría de masa.

Ejemplo 15: Evaluación de la estabilidad de las moléculas de fusión

Para determinar las temperaturas de fusión como un indicador general para la estabilidad global, la molécula de fusión específica de sideróforo de SEQ ID NO: 134 y las muteínas de lipocalina simples (SEQ ID NOs: 16, 36, 53 y 62) se usaron a una concentración de proteína de 1 mg/ml en PBS (Gibco) y se escanearon en un intervalo de temperatura de 25-100°C con un incremento de 1°C/min usando un instrumento nanoDSC capilar (CSC 6300, TA Instruments). Las temperaturas de fusión (T_m) se calcularon a partir del termograma presentado usando el software integrado Nano Analyze. Las temperaturas de fusión resultantes así como el inicio de la fusión se listan en la Tabla 9 siguiente.

Tabla 9: T_m e inicio de la fusión según se determina por nanoDSC para muteínas de lipocalina simples y una molécula de fusión específica para sideróforos de *P. aeruginosa*.

			T _m : °C	inicio de la fusión: °C
Molécula de fusión		SEQ ID NO: 134	64 / 66	57
Muteínas de lipocalina simples	Pvd I	SEQ ID NO: 16	70	61
	Pvd II	SEQ ID NO: 36	71	66
	Pvd III	SEQ ID NO: 53	69	63
	Pch	SEQ ID NO: 62	76	67

El inicio de la fusión es entre 61 – 67°C para las muteínas de lipocalina simples (SEQ ID NOs: 16, 36, 53 y 62) y 57°C para la molécula de fusión (SEQ ID NO: 134). La temperatura de fusión es entre 66 – 76°C para las muteínas de lipocalina simples (SEQ ID NOs: 16, 36, 53 y 62) y 64/66°C para la molécula de fusión (SEQ ID NO: 134). El inicio de la fusión y la temperatura de fusión, aunque ligeramente menor para la molécula de fusión comparado con las muteínas de lipocalina simples, es comparable entre la molécula de fusión y las muteínas de lipocalina simples e indica una buena estabilidad para las proteínas.

Para evaluar la estabilidad en el almacenamiento y congelación/descongelación, la molécula de fusión de SEQ ID NO: 134 o la molécula de fusión con Fc de SEQ ID NO: 136 a una concentración de 1 mg/ml en PBS se incubaron durante 1 semana a 37°C ó 42°C o se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación. La concentración de molécula de fusión activa se midió en un marco de ensayo ECL cuantitativo. Se emplearon tres formatos de unión simultáneos diferentes como se describe en el Ejemplo 8 para examinar la capacidad de unirse a cada pioverdina (I, II y III) y pioquelina simultáneamente. El área del pico de la proteína monomérica se midió en una cromatografía de exclusión por tamaño analítica.

Para el ensayo ECL cuantitativo como se describe en el Ejemplo 9, se preparó una curva de calibración incluyendo 11 diluciones que variaron típicamente de 0,1 – 5.000 ng/mL y se prepararon tres diluciones diferentes independientes en el intervalo lineal de la curva de calibración para cada muestra. Se usó tampón de bloqueo suplementado opcionalmente con 1% de plasma humano para las diluciones. La curva de calibración se ajustó usando un modelo de regresión no lineal logístico de 4 parámetros (4PL) y se usó para calcular las concentraciones de proteína activa para las muestras ensayadas. Las concentraciones de proteína activa determinadas se referenciaron frente a una muestra no estresada almacenada a la misma concentración en la misma matriz.

La cromatografía de exclusión por tamaño analítica se realizó en un sistema de HPLC Agilent con dos columnas Superdex 75 5/150 GL (GE Healthcare) en línea usando PBS (Gibco) como

un eluyente a una velocidad de flujo de 0,3 mL/min. Las áreas del pico del monómero de las muestras estresadas y referencias no estresadas se calcularon usando un software WinGPC Unichrom GPC / SEC (PSS: Polymer Standards Service-USA Inc.). La recuperación del área del pico del monómero se calculó como recuperación = área del pico del monómero en la muestra / área del pico del monómero en la referencia. Para evaluar la estabilidad en el almacenamiento en plasma, se incubaron una molécula de fusión y una molécula de fusión con Fc a una conc. de 0,5 mg/ml durante 1 semana a 37°C en plasma humano. La concentración de la molécula de fusión activa se midió en un marco de ensayo ECL cuantitativo como se ha descrito anteriormente.

10

Los datos para las construcciones de SEQ ID NO: 134 y SEQ ID NO: 136 se muestran en la Tabla 10 siguiente. Las construcciones de molécula de fusión y molécula de fusión con Fc presentaron una alta estabilidad en todas las condiciones ensayadas.

Tabla 10: Estabilidad después de 3 ciclos de congelación/descongelación (F/T); 1 semana de almacenamiento en PBS a 37°C ó 42°C y 1 semana de almacenamiento en plasma humano (hu) evaluada por recuperación de la actividad en qELISA y contenido en monómero en SEC analítica: completamente estable en qELISA = 100 +/- 15 %; completamente estable en aSEC = 100 +/- 5% (recuperación del área del pico del monómero comparado con la muestra de referencia no estresada); Φ : Recuperación media en qELISA para captura de Pvd I, II, III.

	3x F/T -20°C, 1mg/ml					1 semana a 37°C PBS 1mg/ml					1 semana a 42°C PBS 1mg/ml					1 semana plasma hu 37°C 0.5mg/ml			
	%recuperación de actividad en qELISA				aSEC	%recuperación de actividad en qELISA				aSEC	%recuperación de actividad en qELISA				aSEC	%recuperación de actividad en qELISA			
	captura PvdI	captura Pvd II	captura Pvd III	Φ	% monómero	captura PvdI	captura Pvd II	captura Pvd III	Φ	% monómero	captura PvdI	captura Pvd II	captura Pvd III	Φ	% monómero	captura PvdI	captura Pvd II	captura Pvd III	Φ
	Detección por pch-sulfotag					Detección por pch-sulfotag					Detección por pch-sulfotag					Detección por pch-sulfotag			
SEQ ID NO: 134	94%	96%	94%	95%	96%	111%	100%	104%	105%	97%	87%	88%	92%	89%	103%	91%	92%	104%	96%
SEQ ID NO: 136	94%	95%	95%	95%	99%	99%	103%	106%	103%	100%	92%	97%	110%	100%	100%	78%	79%	83%	80%

Ejemplo 16: Afinidad de las molécula de fusión para sideróforos de *P. aeruginosa* determinada en un marco basado en ELISA

La unión en disolución de muteínas individuales, moléculas de fusión o moléculas de fusión con Fc se evaluó por un "ELISA de unión en disolución", cuyo principio fue como sigue: se incubó una concentración constante de la muteína individual ensayada o construcción de molécula de fusión con concentraciones variables de ligandos (Pvd I s, sa, aKG +/-Fe / Pvd II s, sa, aKG +/-Fe / Pvd III s, sa, aKG +/-Fe / Pch +/-Fe) durante 1 h. Después de esta pre-incubación en disolución, se transfirió una alícuota de la mezcla muteína/ligando a una placa ELISA con Pvd I s (+Fe), Pvd II s (+Fe), Pvd III s (+Fe) o Pch biotinilada inmovilizada mediante Neutravidina para medir la concentración remanente de muteína o construcción de molécula de fusión libre. La concentración de muteína o construcción de molécula de fusión libre (no unida a ligando) se determinó mediante un ajuste de ELISA cuantitativo.

Con detalle, una placa de 384 pocillos adecuada para medidas de fluorescencia (Greiner FLUOTRAC™ 600, fondo plano negro, alta unión) se recubrió con 20 µl de Neutravidina a una concentración de 5 µg/ml en PBS toda la noche a 4°C. Después de lavar, los pocillos recubiertos con Neutravidina se bloquearon con 100 µl de tampón de bloqueo que contenía 0,1% Tween 20 y 2% BSA (PBS-T/BSA) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar de nuevo, se añadieron 20 µl de pioverdina o pioquelina biotinilada en tampón de bloqueo a una concentración de 1 µg/mL durante 1 h a temperatura ambiente y el reactivo en exceso se eliminó. Se incubó una concentración fija de muteína o construcción de molécula de fusión en disolución con varias concentraciones de ligando (Pvd I s, sa, aKG +/-Fe / Pvd II s, sa, aKG +/-Fe / Pvd III s, sa, aKG +/-Fe / Pch +/-Fe), usando una concentración de partida adecuada que se diluyó de forma seriada a una proporción 1:3 hacia abajo hasta el rango picomolar en PBS-T/BSA. Después de 1h de incubación a temperatura ambiente, se transfirieron 20 µl de la mezcla de reacción a la placa de 384 pocillos después de lo cual se inmovilizó pioverdina o pioquelina biotinilada para capturar la muteína o construcción de molécula de fusión no unidas (libres) durante 20 min a RT. Para permitir la transformación de los resultados de lectura ELISA en concentraciones absolutas de muteína/ construcción de molécula de fusión libre, se preparó una curva estándar que contenía varias concentraciones de muteína/construcción de molécula de fusión en PBS-T/BSA y se incubó también durante 20 min en la misma placa ELISA.

Los sobrenadantes residuales se desecharon y se añadieron 20 µl de anticuerpo anti-hNGAL marcado con HRP a una concentración óptima predeterminada en PBS-T/BSA y se incubó durante 1 h a RT. El anticuerpo anti-hNGAL se había obtenido por inmunización de conejos con una mezcla de muteínas, y se acopló posteriormente a HRP usando un kit (EZ-link Plus Activated Peroxidase, Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante, para obtener el

conjugado anticuerpo-HRP. Después de lavar, se añadieron 20 µl de sustrato de HRP fluorogénico (QuantaBlu, Thermo) a cada pocillo, y la reacción se dejó proceder durante 15 a 60 minutos. La intensidad de fluorescencia de cada pocillo en la placa se leyó usando un lector de fluorescencia en microplacas (Tecan o Molecular Devices). Para evaluar los datos, se

5 calculó la concentración de muteína o construcción de molécula de fusión libre, $c(\text{muteína/molécula de fusión})_{\text{libre}}$, sobre la base de los resultados de la curva estándar, y se representaron frente a la concentración de ligando, $c(\text{Ligando})$. Los valores Cl_{50} se ajustaron por regresión no lineal con un modelo de unión de único sitio. El ajuste de las curvas se realizó usando software GraphPad Prism 4.

10 Los valores Cl_{50} resultantes se resumen en las Tabla 11. La molécula de fusión y la molécula de fusión con Fc se unieron a todos los sideróforos respectivos con virtualmente la misma afinidad que las muteínas individuales.

15 Tabla 11: Unión de proteínas de molécula de fusión, molécula de fusión con Fc con muteínas de lipocalina fusionadas al extremo N del dominio Fc y muteínas de lipocalina simples a diana en disolución. Se usó una concentración de trazador de 0,1 nM de muteína de lipocalina o molécula de fusión (0,2 nM para SEQ ID NO: 16) – por lo tanto, la sensibilidad del ensayo no estaba limitada. PvdX: Pvd I, Pvd II, Pvd III.

Formato	Grupo diana		Unión a diana en disolución; Cl_{50} : nM							
			Pvd x s (+Fe)	Pvd x sa (+Fe)	Pvd x aKG (+Fe)	Pvd x s (-Fe)	Pvd x sa (-Fe)	Pvd x aKG (-Fe)	pch +Fe	pch -Fe
Molécula de fusión	Pvd I	SEQ ID NO: 134	1.9	0.8	1.6	1.4	0.92	1.0		
	Pvd II		0.3	0.4	0.88	0.47	0.45	0.81		
	Pvd III		0.2	0.31	0.58	0.18	0.27	0.7		
	pch								8.4	47
Fc-molécula de fusión	Pvd I	SEQ ID NO: 136	2	no ensayado						
	Pvd II		0.4							
	Pvd III		0.4							
	pch								1.7	7.9
Muteínas de Lipocalina simples	Pvd I	SEQ ID NO: 16	1.9	no ensayado						
	Pvd II	SEQ ID NO: 36	0.55							
	Pvd III	SEQ ID NO: 53	0.28							
	pch	SEQ ID NO: 62							7.4	41

20 Las construcciones de molécula de fusión y molécula de fusión con Fc se unen a las dianas Pvd con valores Cl_{50} en el intervalo subnM a 2 nM, a Pch cargada con hierro con una $Cl_{50} < 10$ nM y a Pch sin hierro con una $Cl_{50} < 50$ nM comparable con los valores Cl_{50} de las

25 muteínas de lipocalina simples respectivas como se muestra de forma ejemplar para PvdX s (+Fe) y pioquelina (+/-Fe), demostrando que la potencia de unión de las muteínas de lipocalina individuales se mantiene completamente en los formatos de moléculas de fusión.

Ejemplo 17: Comparación de la potencia de unión de diferentes formatos de moléculas de fusión determinada en un marco basado en ELISA

Se ensayó la unión de las construcciones molécula de fusión con Fc de SEQ ID NOs: 137, 138 y 139 (véase el Ejemplo 1 y las Figuras 10B, C y D) en comparación con las muteínas de lipocalina individuales contenidas (SEQ ID NOs: 34, 17, 50 y 63) a los grupos de sideróforos respectivos (Pvd Is (+Fe), Pvd IIs (+Fe), Pvd IIIs (+Fe) y Pch) en disolución en un ensayo de unión en disolución comparable con el descrito en el Ejemplo 5.

Como se muestra en la Tabla 12 y la Figura 12, los valores CI_{50} resultantes son comparables para las muteínas de lipocalina individuales y los diferentes formatos de molécula de fusión con Fc.

Tabla 12: Unión de proteínas molécula de fusión con Fc y muteínas de lipocalina simples a dianas respectivas en disolución. Se usó una concentración de trazador de 0,1 nM ó 0.2 nM molécula de fusión con Fc o muteína de lipocalina – por lo tanto, la sensibilidad del ensayo no estaba limitada. La variante succinilo cargada con hierro de Pvd I, Pvd II y Pvd III se usó como representativa del grupo pioverdina respectivo.

	Afinidad para diana soluble simple CI_{50} :nM			
	Pvd I s (+Fe)	Pvd II s (+Fe)	Pvd III s (+ Fe)	pch (+Fe)
SEQ ID NO: 137	7,3	0,7	0,33	9,8
SEQ ID NO: 138	5,4	0,5	0,46	9,5
SEQ ID NO: 139	6	0,57	0,31	7,8
SEQ ID NO: 34, 17, 50, 63	4,6	0,47	0,31	5,6

Ejemplo 18: Afinidad de la unión de la molécula de fusión a sideróforos de *P. aeruginosa* determinada en un ensayo Biacore

En un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (SPR) se usó un instrumento Biacore T200 (GE Healthcare) para medir la afinidad de unión de las muteínas individuales o moléculas de fusión a sideróforos de pioverdina (a pioverdina I succinilo, -succinamida, - α -cetoglutarilo con ión hierro en complejo o a pioverdina II succinilo, -succinamida, - α -cetoglutarilo con ión hierro en complejo o a pioverdina III succinilo, -succinamida, - α -cetoglutarilo con ión hierro en complejo). Para este fin, las muteínas seleccionadas para la unión a pioverdinas (SEQ ID NOs: 16, 36, 53), una molécula de fusión (SEQ ID NO: 134) y un control negativo (SEQ ID NO: 64) se biotinilaron durante 2 h a temperatura ambiente aplicando un exceso apropiado de EZ-Link NHS-PEG4-Biotina (Thermo, Cat# 21329) seguido de

separación de la biotina que no ha reaccionado usando una placa desaladora Zeba Spin (Thermo, Cat# 21329) según las instrucciones del fabricante.

En el ensayo de afinidad SPR, las muteínas y control negativo biotinilados se capturaron en un chip sensor CAP usando el kit de captura de biotina (GE Healthcare), en el que el chip sensor CAP se pre-inmoviliza con un oligo ADNss. El reactivo de captura de biotina no diluido (conjugado con estreptavidina con el oligo ADNss complementario) se aplicó a una velocidad de flujo de 2 μ l/min durante 300 s. Posteriormente, se aplicaron 20 μ g/ml a 100 μ g/mL de las muteínas o control negativo molécula de fusión biotinilados durante 300 s a una velocidad de flujo de 5 μ l/min. El canal de referencia se cargó sólo con reactivo de captura de biotina. Para determinar la afinidad de unión, se prepararon cuatro diluciones de las Pvd respectivas en tampón HBS-EP+ (GE Healthcare) y se aplicaron a la superficie del chip. Aplicando una velocidad de flujo de 30 μ l/min, se usó una estrategia de cinética de único ciclo con un tiempo de contacto de la muestra de 180 s y un tiempo de disociación de 1.800 - 2.400 s. La ausencia de unión al control negativo de SEQ ID NO: 64 se confirmó usando una alta concentración de 1.200 nM de la Pvd respectiva. Después de la inmovilización del ligando, se aplicaron las cuatro concentraciones de Pvd consecutivamente en orden ascendente antes de monitorizar la disociación. Todas las medidas se realizaron a 25°C. La regeneración de la superficie del chip sensor se consiguió con una inyección de 6 M Gua-HCl con 0,25 M NaOH seguido de un lavado extra con tampón de operación y un periodo de estabilización de 120 s. Los datos se evaluaron con software Biacore T200 Evaluation (V 1.0). Se realizó una referencia doble. Se usó un modelo de unión 1:1 para ajustar los datos brutos. Además, la ausencia de unión a varios sideróforos no producidos por *P. aeruginosa* y a MMP-9 se confirmó usando el ensayo descrito anteriormente aplicando altas concentraciones (≥ 1 μ M) de los analitos siguientes a la molécula de fusión inmovilizada: Fe-enterobactina, desferoxamina, MMP-9 proforma y MMP-9 activado.

Análisis Biacore para la determinación de la afinidad de muteínas de lipocalina a pioquelina
Para la determinación de las constantes cinéticas y K_D resultante para la interacción de la muteína SEQ ID NO: 62 con Pch +Fe, la muteína o el control negativo (SEQ ID NO: 64) se inmovilizó en la superficie de un chip CM5 usando química de amina estándar: La superficie del chip se activó usando EDC y NHS. Posteriormente, se aplicaron 5 μ g/mL de muteína o disolución de control negativo en 10 mM acetato pH 4,0 a una velocidad de flujo de 10 μ l/min hasta que se consiguió un alto nivel inmovilización de aproximadamente 2.000 RU. Los grupos activados residuales se apantallaron con etanolamina. Los canales de referencia se trataron con EDC/NHS seguido de etanolamina (inmovilización de blanco). Para determinar la afinidad, se prepararon cuatro a cinco diluciones de pioquelina (+/-Fe), en tampón HBS-P+ y se aplicaron a la superficie del chip preparada. El ensayo de unión se llevó a cabo con un tiempo

de contacto de 180 s, tiempos de disociación de 1.500 - 1.800 s y aplicando una velocidad de flujo de 30 µl/min. Las medidas se realizaron a 25°C. La regeneración de la superficie de la muteína inmovilizada se consiguió por tres inyecciones consecutivas de 10 mM Gly-HCl pH 1,5 (120 s) seguido de un lavado extra con tampón de operación y un periodo de estabilización.

- 5 Los datos se evaluaron con software Biacore T200 Evaluation (V 1.0). Se usó una referencia doble. Se usó el modelo de unión 1:1 para ajustar los datos brutos. Usando el mismo ensayo, la ausencia de unión a los sideróforos diferentes de pioquelina y a MMP-9 se confirmó aplicando altas concentraciones ($\geq 1 \mu\text{M}$) de los analitos siguientes a la muteína inmovilizada de SEQ ID NO: 62: Fe-enterobactina, desferoxamina, pioverdina, MMP-9 proforma y MMP-9
- 10 activado.

Análisis Biacore para la detección de unión de la molécula de fusión a pioquelina.

- La unión específica de pioquelina a la molécula de fusión capturada de SEQ ID NO: 134 se demostró claramente en un ensayo basado en SPR usando un chip sensor serie S NTA y kit de
- 15 reactivo NTA (ambos GE Healthcare). La molécula de fusión etiquetada con His (SEQ ID NO: 134) y muteínas de lipocalina etiquetadas con His (SEQ ID NO: 16 que se unen a Pvd II y SEQ ID NO: 53 que se unen a Pvd II, ambos usados como controles negativos) se capturaron mediante NTA cargado con Ni^{2+} . La pioquelina se usó como analito. Aunque la unión de pioquelina (+/- Fe) fue claramente detectable y los sensogramas fueron bastante comparables
- 20 a la unión de pioquelina a la muteína inmovilizada covalentemente SEQ ID NO: 62, las constantes cinéticas no pudieron determinarse debido a la inestabilidad de la superficie preparada (disociación de la molécula de fusión capturada del chip Níquel-NTA).

- Los resultados de los diferentes análisis Biacore para la molécula de fusión y las muteínas de lipocalina simples correspondientes se resumen a continuación en la Tabla 13.
- 25

Tabla 13: Constantes cinéticas evaluadas en un ensayo Biacore a dianas respectivas y ensayo de especificidad. Pvd x: Pvd I, Pvd II, Pvd III.

			Determinación de afinidad en Biacore ; KD : nM										Fe-Enterobactina	Desferoxamina	MMP3 proforma	MMP3 activado
	Grupo diana		Pvd x s +Fe	Pvd x sa +Fe	Pvd x aKG +Fe	Pvd x s -Fe	Pvd x sa -Fe	Pvd x aKG -Fe	pch +Fe	pch -Fe						
Molécula de fusión	Pvd I	SEQ ID NO: 134	3.24	1.06	4.72	5.73	4.01	4.73			bdg detectable pero alta deriva					
	Pvd II		0.21	0.23	1.19	1.51	1.79	3.27								
	Pvd III		0.53	0.27	1.04	3.07	1.65	18.71								
	pch															
Mutéínas de Lipocalina simples	Pvd I	SEQ ID NO: 16	5.28													no bdg
	Pvd II	SEQ ID NO: 36	0.24													
	Pvd III	SEQ ID NO: 53	0.62													
	pch	SEQ ID NO: 62								0.29	39.55					

Las afinidades medidas en un ensayo Biacore para la molécula de fusión y muteínas de lipocalina frente a Pvd I s +Fe, Pvd II s +Fe y Pvd III s +Fe son comparables. Las afinidades medidas en Biacore para la molécula de fusión de SEQ ID NO: 134 frente a todos los subtipos de Pvd están en el intervalo subnanomolar a nanomolar de un dígito y también son comparables con los valores CI_{50} determinados en el ELISA de unión en disolución descrito en el Ejemplo 5. Además, las afinidades de unión son similares a dianas de pioverdina con y sin hierro unido. La unión de la molécula de fusión de SEQ ID NO: 134 a pioquelina fue detectable en un ensayo Biacore con captura de la molécula de fusión etiquetada con His de SEQ ID NO: 134 mediante Ni-NTA, pero debido a la alta deriva, no pudo determinarse una K_D precisa. Los retos para poner a punto un ensayo SPR para detectar la unión a una diana orgánica pequeña tal como pioquelina no fueron inesperados. La evaluación de la especificidad confirmó que la molécula de fusión de SEQ ID NO: 134 y las muteínas de lipocalina simples de SEQ ID NOs: 16, 36, 53 y 62 se unen específicamente a sus dianas pero no a otros sideróforos, es decir, Fe-enterobactina y desferoxamina o a la proteína MMP-9. Las muteínas de lipocalina de SEQ ID NOs: 1 y 64 usadas como control positivo para Fe-enterobactina, mostraron unión al ligando natural Fe-enterobactina y los anticuerpos específicos de MMP-9 usados como control positivo para MMP-9, mostraron unión a MMP-9. SEQ ID NO: 64 no mostró unión a pioverdinas o pioquelina (datos no mostrados).

Ejemplo 19: Unión simultánea de moléculas de fusión a pioverdina y pioquelina

La unión simultánea de una molécula de fusión (SEQ ID NO: 134) a dos dianas representativas de los cuatro grupos diana respectivos a la vez (pioverdina I succinilo (+Fe) y pioquelina, pioverdina II succinilo (+Fe) y pioquelina o pioverdina III succinilo (+Fe) y pioquelina) se mostró en un ensayo electroquimioluminiscente (ECL) realizado en una plataforma Meso Scale discovery (MSD). Brevemente, la pioverdina biotinilada respectiva se capturó en una placa MSD mediante Neutravidina y se añadieron concentraciones variables de molécula de fusión. La molécula de fusión unida se detectó con pioquelina marcada con etiqueta Sulfo.

A no ser que se especifique otra cosa, todas las etapas de incubación se realizaron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación a 300 rpm, y la placa se lavó después de cada etapa de incubación con 80 μ l de tampón PBST (PBS pH 7,4, 0,05 % Tween 20) cinco veces usando un lavador Biotek ELx405 select CW. El tampón de ensayo fue PBST/BSA (PBS pH 7,4, 0,1% Tween 20, 2% BSA). Se recubrió una placa de 384 pocillos MSD (L25XA, Meso Scale Discovery) con 20 μ L de Neutravidina a una concentración de 5 μ g/mL en PBS toda la noche a 4°C. Después de lavar, los pocillos recubiertos se bloquearon con 60 μ L de tampón de bloqueo (PBST/BSA), y se añadió pioverdina biotinilada a una concentración de 0,2 μ g/mL y se incubó después de una etapa de lavado adicional. La concentración de la molécula de fusión se ajustó

a 5 µg/mL, y después la disolución se diluyó de manera seriada a una proporción 1:3 en PBS-T/BSA. Se transfirió un volumen de 20 µL de la dilución a la placa de 384 pocillos y se dejó unir durante 1 h. Después de la incubación, los sobrenadantes residuales se desecharon, y se añadieron 20 µL de pioquelina marcada con etiqueta Sulfo a 0,1 µg/mL en PBS-T/BSA y se incubó durante 1 h. Después de lavar, se añadieron 35 µL de tampón de lectura T MSD concentrado 2x con tensioactivo (R92TC, Meso Scale Discovery), y la placa se midió en un lector Sector Imager 2400 (MSD) en 15 minutos. Las señales de ECL se representaron frente a la concentración de molécula de fusión y se ajustaron usando un modelo de unión de sitio único en Prism Graphpad 5. Los valores CE₅₀ resultantes no son representativos para las afinidades de unión.

Pudo detectarse la unión simultánea de la molécula de fusión a cada uno de los representantes del tipo de pioverdina respectivo (Pvd I s (+Fe), Pvd II s (+Fe) y Pvd III s (+Fe)) y pioquelina. Las curvas de unión resultantes se muestran en la Figura 13.

Ejemplo 20: Ensayo funcional de la unión de moléculas de fusión a sideróforos de *P. aeruginosa* –inhibición de la captación de hierro

Para determinar la inhibición de la captación de hierro funcional en bacterias vías, se incubó una concentración de intervalo de dosis de la molécula de fusión de SEQ ID NO: 134 durante 1 hora con 100 nM sideróforo cargado con hierro radiactivo en un tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 antes de incubar durante 30 minutos con bacterias a una concentración final de DO=1 a 595 nm en una placa de 96 pocillos. Posteriormente, las bacterias se filtraron con un recolector celular a través de un filtro GF/B de placa de 96 pocillos preincubado con una disolución de poli etilen imina al 5% y lavado 3 veces con una disolución al 5% de BSA. Después de filtrar y secar, se añadieron 30 µl de mezcla de centelleo en cada pocillo de filtro antes de contar. El sideróforo pioverdina cargado con hierro se incubó durante 15 minutos con ⁵⁵Fe-Cl₃ en tampón Tris con una proporción 4 a 1 de pioverdina y hierro en una disolución final 200 µM. Para cargar pioquelina con hierro radiactivo, se añadieron 40 µl de disolución de ⁵⁵FeCl₃ a 0,25 mM en HCl 0,5 N a una disolución de metanol de pioquelina a 1 mM. Después de un tiempo de incubación de 15 minutos, se añadieron 940 µl de Tris HCl 50 mM pH 8,0 para obtener una disolución 20 µM de ⁵⁵Fe-Pch con una proporción 2 a 1 entre pioquelina y hierro. Las bacterias se prepararon como sigue: 10 ml de un cultivo de toda la noche en medio Mueller Hinton inoculado con un clon aislado se centrifugó, y el sedimento lavado se resuspendió en 25 ml de medio succinato y se incubó con agitación durante 2 horas. En paralelo, se inocularon 20 ml de medio Mueller Hinton con 5 ml del cultivo de toda la noche y se incubó con agitación durante 2 horas para usarse como el nivel de captación de hierro basal. Los cultivos de bacterias de 25 ml se centrifugaron y se lavaron con el medio correspondiente antes de que el

sedimento se resuspendiera en tampón Tris.HCl 50 mM pH 8,0 y se midiera la DO a 595 nm para tener una concentración final en el ensayo de DO = 1. Se calculó el porcentaje de incorporación para cada punto de concentración y se calculó la inhibición con software propio. Para este cálculo, el nivel máximo de captación de hierro se basó en el valor obtenido en medio succinato mínimo sin ninguna molécula de fusión, y el valor basal se obtuvo en el medio Mueller Hinton rico donde no se expresa el receptor del sideróforo.

La molécula de fusión bloqueó de manera efectiva la captación de hierro en células vivas (véase la Tabla 14 y la Tabla 15). Mostró una inhibición comparable de la captación de hierro como las muteínas de lipocalina simples y los valores CI_{50} estuvieron en el intervalo 100 - 200 nM (Tabla 14). Las muteínas de lipocalina simples sólo pueden bloquear la captación de hierro de la cepa de *P. aeruginosa* que expresa el grupo de pioverdina respectivo, es decir, SEQ ID NO: 16 sólo puede bloquear la captación de hierro en cepas de *P. aeruginosa* que expresan pioverdinas del grupo I, SEQ ID NO: 36 sólo puede bloquear la captación de hierro en cepas de *P. aeruginosa* que expresan pioverdinas del grupo II y SEQ ID NO: 53 sólo puede bloquear la captación de hierro en cepas de *P. aeruginosa* que expresan pioverdinas del grupo III. SEQ ID NO: 62 sólo puede bloquear la captación de hierro en cepas de *P. aeruginosa* mediadas por pioquelina. La proteína molécula de fusión, sin embargo, puede bloquear la captación de hierro en todas las cepas de *P. aeruginosa*, es decir, SEQ ID NO: 134 puede bloquear la captación de hierro en cepas que expresan Pvd I, II y III así como la captación de hierro mediada por pioquelina.

Tabla 14: La molécula de fusión y las muteínas de lipocalina simples bloquean la captación de hierro de cepas de *P. aeruginosa* en el mismo intervalo de CI_{50} .

		Ensayo de captación de hierro; CI_{50} : nM				
		Cepa de <i>P. aeruginosa</i>	Cepa Pvd I ATCC15692	Cepa Pvd II ATCC27853	Cepa Pvd III ATCC33360	Cepa dependiente de Pch ATCC15692 $\Delta pvdA$
			Pvd I s	Pvd II s	Pvd III s	Pch
Molécula de fusión	SEQ ID NO: 134		108	116	153	177
Muteínas de lipocalina simples	SEQ ID NO: 16		123			
	SEQ ID NO: 36			109		
	SEQ ID NO: 53				134	
	SEQ ID NO: 62					221

Tabla 15: La molécula de fusión bloquea la captación de hierro en células bacterianas vivas.

Molécula de fusión	Inhibición de la captación de hierro CI_{50} nM								
	Pvd I			Pvd II			Pvd III		
	succinilo	succinamida	a-cetoglutarilo	succinilo	succinamida	a-cetoglutarilo	succinilo	succinamida	a-cetoglutarilo
	104	99	181	117	107	51.4	116	68	112
									165

Ejemplo 21: Ensayo funcional de la unión de moléculas de fusión a sideróforos de *P. aeruginosa* –inhibición del crecimiento

La inhibición del crecimiento bacteriano se determinó incubando la molécula de fusión de SEQ ID NO: 134 que se une a sideróforos de *P. aeruginosa* en el medio succinato tratado con Chelex complementado con una disolución de elemento traza y 0,1 mg/ml BSA con un cultivo bacteriano en MS diluido a una DO final de 0,05 a 595 nm en una placa negra de 96 pocillos con fondo transparente. La placa se incubó toda la noche a 37°C con agitación cada 20 minutos y lectura de DO a 595 nm en un lector IEMS MF de Thermo Labsystem.

En las Figuras 14A a D, la inhibición del crecimiento se muestra de forma ejemplar para las cepas de *P. aeruginosa* con tipo diferente de pioverdina (cepa Pvd I, cepa Pvd II y cepa Pvd III) y para una cepa con el gen de pvdA deletado para demostrar la inhibición de la captación de hierro mediada por pioquelina. El control fue crecimiento bacteriano en ausencia de mutoínas de lipocalina.

La molécula de fusión fue capaz de inhibir el crecimiento de cada una de las cepas de *P. aeruginosa* ensayadas.

Ejemplo 22: Potencia *in vivo* de las moléculas de fusión

P. aeruginosa, PA01, recuperó de almacenamiento a largo plazo a -80°C por sub-cultivo en placas de agar de sangre frescas e incubando a 37°C toda la noche. El inóculo se preparó tomando 5-10 colonias distintas de las placas de cultivo seguido de suspensión en 10 mL de caldo Muller-Hinton. El cultivo se incubó durante 18 horas en un agitador orbital a 300 rpm y 37°C. El cultivo se lavó dos veces en PBS, después el sedimento se resuspendió en PBS y se ajustó a una densidad óptica de 0,669 a 600 nm (aproximadamente $1,2 \times 10^9$ CFU/mL). Esto se diluyó adicionalmente para proporcionar una concentración de inóculo de 6×10^7 CFU/mL. Se añadió 1 mL de este inóculo a 30 mL de agar bacteriológico, usado para preparar los lechos de agarosa (Cash H.A. et al., 1979). La concentración final de PA01 en los lechos de agarosa fue 2×10^6 CFU/mL (1×10^5 CFU por 50 µL de inóculo). El inóculo se ensayó para infectividad en 3 ratas antes del estudio principal y se consiguió una carga tisular de 5×10^6 CFU/gramo de tejido pulmonar a las 48 horas posteriores a la infección similar a modelos previos.

Las ratas Sprague Dawley usadas en este estudio fueron suministradas por Charles River Laboratories Reino Unido. Las ratas pesaron 200-225 g en el momento de la administración y carecían de patógeno específico. Después de la llegada, se dejó que las ratas se aclimataran al menos 7 días antes de empezar el estudio. Las ratas pesaban 250-300 g al inicio del estudio.

Las ratas se estabularon en grupos en jaulas ventiladas individualmente estériles exponiendo a los animales en todo momento a aire esterilizado por filtración HEPA. Las ratas tuvieron acceso libre a alimento y agua (estéril) y tuvieron lechos de virutas de chopo estériles (cambiado cada 3-4 días o según fue apropiado). La temperatura de la habitación fue $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con una
5 humedad relativa de 50-60% y ruido de fondo máximo de 56dB. Las ratas se expusieron a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas con fases de amanecer/anocheecer. Todos los estudios con animales se realizaron bajo la UK Home Office Licensure y con aprobación por el comité ético local. Todos los estudios se realizaron por técnicos que habían completado las partes 1, 2 y 3 del curso de UK Home Office Personal License y poseían licencias personales actuales.

10

Se infectaron ratas anestesiadas profundamente intratraquealmente con lechos con 50 μL de PA01 incluidos a 1×10^5 CFU/rata. Las ratas control no infectadas se inocularon con suspensión de lechos estéril. El tratamiento se inició 3 días después de la infección, y los animales se dosificaron en los Días 3, 4, 5, 6, 7 y 8 después de la infección. La molécula de
15 fusión (SEQ ID NO: 134; RA10680550) se administró intravenosamente (IV) dos veces al día (bis die, BD) con un intervalo de 5 horas entre las dos dosis. Se administró tobramicina IV BD con un intervalo de 12 horas. Los animales se sacrificaron por eutanasia en los Días 3, 5, 7, 9 y 15 después de la infección. En los días 3, 5 y 7, los animales se sacrificaron por eutanasia 4 horas después de la primera dosis de tratamiento. Desde el Día 9 los animales se sacrificaron
20 por eutanasia en el momento en el que se había proporcionado la primera dosis de tratamiento. Después de la eutanasia, se recogieron lavados broncoalveolares (BAL) y el pulmón se retiró, para recuento de unidades formadoras de colonias (CFU) bacterianas y células blancas y análisis de marcadores citoquinas/inflamatorios.

25 La monoterapia con molécula de fusión mostró una eficacia significativa comparada con el grupo vehículo respectivo y en la mayor parte de los casos aclaró la carga tisular sobre el Día 7 después de la infección (Figura 15).

La tobramicina a 20 mg/kg/dosis aclaró la infección empezando desde el día 5 después de la
30 infección. La terapia de combinación con una molécula de fusión y tobramicina indujo un aclaramiento acelerado de la carga pulmonar, indicando que no había un efecto antagonista de la molécula de fusión sobre la actividad de la tobramicina (Figura 15).

La monoterapia con molécula de fusión mostró propiedades anti-inflamatorias, reduciendo tanto
35 los recuentos de células blancas totales como los números absolutos de monocitos y neutrófilos (Figura 16). La monoterapia con molécula de fusión fue significativamente más efectiva que el vehículo o monoterapia con tobramicina, lo que sugiere que la molécula de fusión es más anti-inflamatoria que la tobramicina. Se observaron resultados similares en el

grupo de la combinación, pero los datos de la monoterapia con la molécula de fusión sugieren que es la molécula de fusión y no la tobramicina la que está dirigiendo los efectos anti-inflamatorios causados por la terapia de combinación.

- 5 Ejemplo 23: Eficacia *in vivo* de las moléculas de fusión en un modelo de ratón de colonización pulmonar con *P. aeruginosa* en la reducción de transcrito con percepción de quorum

P. aeruginosa, PA01, se creció a 37°C en un baño de agua giratorio, con agitación en caldo de soja tríptica (Biomérieux Laboratories, Lyon, Francia) durante 8 h. El inóculo se calibró a 1x10⁹
10 unidades formadoras de colonias (cfu)/ml por espectroscopía y el patógeno se atrapó en lechos de agarosa.

Se mantuvieron ratones macho C57BL/6 (8 semanas de edad) adquiridos en Charles River Laboratories (Domaine des oncins, L'Arbresle, Francia) en una unidad protegida. Todos los
15 experimentos se realizaron con la aprobación del Comité de cuidado y uso animal institucional de Lille. Los ratones se anestesiaron con inhalación de sevoflurano (Abbott, Reino Unido) y se pusieron en decúbito dorsal. Se usó la inserción transtraqueal de una aguja de alimentación animal de 24-G para instilar 60 µl de una preparación de lechos de agarosa (2x10⁵ cfu/ratón)

20 El tratamiento se inició bien 1 h (fase temprana de colonización) ó 48 h (fase tardía de colonización) después de la infección y los animales se dosificaron intraperitonealmente (ip) dos veces al día a intervalos de 5 h durante 2 días.

A las 48 h (para la fase temprana) ó 96 h (para la fase tardía) después de la infección, los ratones se sacrificaron por eutanasia y los pulmones se recogieron para extracción del ARN.
25 Después de retrotranscripción, se llevó a cabo la expresión de ExoA, Alginata y RhL por análisis qPCR.

La molécula de fusión (SEQ ID NO: 134; RA10680550) previene la capacidad de las bacterias de resistir la respuesta inmune del huésped, bloqueando la expresión de los factores de
30 virulencia. El tratamiento con molécula de fusión indujo una reducción significativa de los tres genes principales de la percepción de quorum durante la fase temprana de la colonización (Figura 17A). Este efecto se mantiene para rhII incluso en una colonización establecida (Figura 17B). Estos datos demostraron la potencia de moléculas de fusión para prevenir la capacidad de las bacterias para resistir la respuesta inmune del huésped, bloqueando la expresión de los
35 factores de virulencia.

Ejemplo 24: Efecto de las longitudes de la molécula conectora en la capacidad de unión de las moléculas de fusión

Se ensayaron diferentes longitudes de molécula conectora y composiciones de molécula conectora para el diseño de moléculas de fusión. Más particularmente, se ensayaron longitudes de conector que variaron desde el conector peptídico (G4S)₂ (10 aminoácidos) hasta una única glicina como conector y se encontró que no tenían ninguna influencia o sólo una menor en la unión de dianas simples (Figura 18). Puede asumirse que los conectores peptídicos de más de 10 aminoácidos de longitud tampoco tendrán una influencia negativa en la capacidad de unión de las moléculas de fusión.

Ejemplo 25: Cepas, compuestos, medios y condición de crecimiento

Las cepas de *P. aeruginosa* ATCC15692/PA01 (siderotipo pioverdina I), ATCC27853 (siderotipo pioverdina II y ATCC33360 (siderotipo pioverdina III) se obtuvieron de la American Type Culture Collection y se mantuvieron como se instruye. Los compuestos ensayados fueron molécula de fusión con Fc de SEQ ID NO: 136 (también referida como SAR439349 o RA10680578) o una molécula de fusión con Fc control sin unión (RA11043715). A no ser que se especifique otra cosa, las bacterias se crecieron en medio succinato tratado con Chelex® (C-MS) preparado como sigue: el medio succinato se preparó con K₂HPO₄: 6g/L, KH₂PO₄: 3g/l, (NH₄)₂SO₄: 1g/L, MgSO₄·7H₂O: 0,2g/L, y succinato de sodio: 4 g/L; después se añadió Chelex®-100 (Biorad) a 50 g/L durante 5h a temperatura ambiente antes de filtrar usando membranas de 0,22µm.

Para cada experimento, se crecieron colonias simples de varias cepas de *P.aeruginosa* tomadas de una placa de agar de soja tríptica toda la noche en tubos de cultivo celular con agitación a 37°C en C-MS. Los cultivos de toda la noche se centrifugaron para eliminar la pioverdina presente en el medio de crecimiento. Los sedimentos bacterianos se resuspendieron y se diluyeron en medio C-MS fresco a una densidad de 5.10⁵ cfu/mL y se crecieron en duplicado o triplicado en placas de 96 pocillos con agitación en un incubador a 37°C. Los valores de cfu/mL se aproximaron a partir de la densidad óptica a 600nm (DO600nm) usando la fórmula siguiente: unidad de 0,125 DO600nm = 1,5x10⁸ cfu/mL.

Ejemplo 26: Cinética de la producción de pioverdina en presencia de moléculas de fusión con Fc

Las bacterias preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 25 se crecieron solas (control no tratado) o en presencia de varias dosis de una molécula de fusión con Fc (SEQ ID NO: 136) o

una molécula de fusión con Fc control en un volumen total de 200 μ L en duplicado en placas de 96 pocillos durante 24 horas. A varios tiempos, se midió la fluorescencia de pioverdina en los cultivos como se ha descrito anteriormente (Wilderman et al., 2001, Infect Immun., 69(9), p. 5385-94) directamente en la placa usando un lector de microplacas (Enspire, Perkin Elmer Instruments) con una longitud de onda de excitación de 405nm y una longitud de onda de emisión de 460nm. Simultáneamente, se evaluó la biomasa bacteriana midiendo DO600nm, que se convirtió en cfu/mL. Los experimentos se reprodujeron al menos 5 veces con cada una de las cepas ATCC15692, ATCC27853 y ATCC33360 de *P. aeruginosa*.

Para presentar los datos brutos, se proporcionan las medias y s.e.m. de los valores de cfu/ml y unidades arbitrarias de fluorescencia para un experimento representativo para control no tratado y tratamiento con los dos compuestos (con una respuesta a la dosis) en las Figuras 19A y 19B, respectivamente, para ATCC27853; Figuras 19C y 19D, respectivamente, para ATCC15692 y Figuras 19E y 19F, respectivamente, para ATCC33360. Para tener en cuenta el impacto del compuesto en la biomasa, que podría explicar las diferencias en los niveles de pioverdina, la cantidad promedio de fluorescencia de pioverdina en cada punto de tiempo se dividió por la DO600nm promedio correspondiente. Estas cantidades relativas se normalizaron respecto a la cantidad relativa de fluorescencia de pioverdina del control no tratado. Las cantidades relativas normalizadas se muestran en las Figuras 20A, 20B, 20C para ATCC27853, ATCC15692 y ATCC33360, respectivamente. Los experimentos se realizaron dos veces en triplicado y se representan las medias y s.e.m.. Se realizaron un ANOVA de una vía y ensayos posteriores de Dunnett frente al control no tratado para averiguar el impacto del tratamiento con una molécula de fusión con Fc (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Además, los puntos se ajustaron a una curva de respuesta a la dosis estándar y rindieron valores CI_{50} de 0,04 mg/mL, 0,11 mg/mL y 0,8 mg/mL para ATCC27853, ATCC15692 y ATCC33360, respectivamente.

La especificidad de la señal de fluorescencia a pioverdina se averiguó midiendo la fluorescencia de los cultivos de la cepa ATCC27853, y la de una cepa doble mutante *pvdA/pchD* de ATCC27853 crecida como se ha descrito en el Ejemplo 25. Como muestran los valores medios de fluorescencia obtenidos en este experimento en la Figura 21, la cepa mutante incapaz de sintetizar estos sideróforos no presenta ninguna señal de fluorescencia. Para normalizar la señal de fluorescencia, se usó pioverdina II purificada obtenida del sobrenadante de ATCC27853 de tipo salvaje para adicionar a los cultivos antes de la adquisición de la señal de fluorescencia y se obtuvo una curva de calibración, como se muestra en la Figura 22 por los valores medios de fluorescencia obtenidos en este experimento. Además, con el fin de averiguar que la caída en la señal de fluorescencia en presencia de una molécula de fusión con Fc no se debió a apantallamiento de la fluorescencia después de la

unión a pioverdina por el compuesto, se añadió una molécula de fusión con Fc extemporáneamente a un sobrenadante de cultivo que contenía pioverdina (obtenido con un cultivo filtrado de 24 horas de ATCC27853) y se leyó la fluorescencia inmediatamente y después de 24h. Como se muestra en la Figura 23 con los valores medios de fluorescencia observados en este experimento, no se observó ningún apantallamiento de la fluorescencia.

Tomados conjuntamente, estos experimentos muestran que la fluorescencia medida se debe específicamente a la presencia de pioverdina y que la caída en la fluorescencia observada después de tratamiento con una molécula de fusión con Fc se debe a que el compuesto previene la producción de pioverdina por bacterias que crecen exponencialmente en un medio desprovisto de hierro. Además, este fenómeno es robusto y se observa en cepas representativas de los tres siderotipos.

Ejemplo 27: Cinética de crecimiento en presencia de moléculas de fusión con Fc

Las bacterias preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 25 se crecieron solas (control no tratado) o en presencia de 0,1 ó 1mg/mL de una molécula de fusión con Fc (SEQ ID NO: 136) o una molécula de fusión con Fc control sin unión en un volumen total de 200 μ L en duplicado en placas de 96 pocillos durante 24 horas. Cada 30 min., se midió la DO600nm directamente en la placa y se convirtió en cfu/mL. Los experimentos se reprodujeron 5 veces con varias cepas de *P. aeruginosa* y los experimentos representativos que ejemplifican el impacto del tratamiento con 1 mg/mL en ATCC15692 y ATCC33360 se muestran como medias y s.e.m. de cfu/mL en las Figuras 24A y 24B, respectivamente. Se calculó la velocidad de crecimiento de las fases exponenciales de las curvas de crecimiento y se representan como Δ cfu.mL⁻¹. Δ h⁻¹ en la Tabla 16.

Tabla 16: Velocidad de crecimiento de las fases exponenciales de las curvas de crecimiento para bacterias tratadas con molécula de fusión con Fc.

	Molécula de fusión con Fc	Pendiente (Δ cfu.mL ⁻¹ . Δ h ⁻¹)	Molécula de fusión con Fc control	Pendiente (Δ cfu.mL ⁻¹ . Δ h ⁻¹)
ATCC15692	0	0,619		
	0,1 mg/mL	0,181	0,1 mg/mL	0,508
	1 mg/mL	0,098	1 mg/mL	0,487
ATCC33360	0	0,572		

	0,1 mg/mL	0,387	0,1 mg/mL	0,419
	1 mg/mL	0,111	1 mg/mL	0,356

Globalmente, estos resultados muestran que la molécula de fusión con Fc está ralentizando específicamente el crecimiento exponencial de bacterias en un medio desprovisto de hierro y que este fenómeno se observa en cepas representativas de los tres siderotipos.

5 El impacto de otra molécula de fusión (RA10680550; SEQ ID NO: 134) a 10 μ M en el crecimiento bacteriano en medio C-MS también se ensayó frente a 5 aislados clínicos VAP recientes de *P. aeruginosa*, y en todos los 5 casos se observó una reducción en la pendiente del crecimiento exponencial.

10 Ejemplo 28: Impacto de moléculas de fusión con Fc en la actividad del promotor *pchD*

Se ha mostrado que la expresión de genes de la biosíntesis de pioquelina está regulada de forma positiva por pioquelina con hierro unido que actúa a un nivel transcripcional mediante el regulador PchR (Heinrichs et al., 1996, J Bacteriol., 178(9), p. 2586-92). Con el fin de ensayar el impacto de moléculas de fusión con Fc en la expresión de genes de la biosíntesis de pioquelina, el operón *luxCDABE* sintético se clonó bajo el control del promotor *pchD* y la fusión *PpchD::lux* se insertó en el cromosoma de ATCC33360.

20 Para medir la actividad del promotor *pchD*, se creció ATCC33360 que porta la fusión *PpchD::lux* sola (control no tratado) o en presencia de 0,1 ó 1mg/mL de una molécula de fusión con Fc (SEQ ID NO: 136) o una molécula de fusión con Fc control sin unión y en presencia de varias cantidades de FeCl_3 en un volumen total de 200 μ L en duplicado en placas de 96 pocillos durante 24 horas, con agitación en un incubador a 37°C. Después de 24h de crecimiento, se midió la luminiscencia directamente en la placa usando un lector de microplacas (Enspire, Perkin Elmer Instruments).

El impacto de la concentración de hierro en la actividad transcripcional de *Ppchd* se evaluó en 3 experimentos independientes realizados en triplicado, y un experimento representativo se muestra en la Figura 25 como medias y s.e.m. de la luminiscencia observada. Como se esperaba, la expresión del promotor *pchD* se indujo en el medio C-MS sin la adición de hierro y se reprimió por la adición de hierro. Esto valida la funcionalidad de la fusión de informador.

El impacto del tratamiento con la molécula de fusión con Fc en la actividad transcripcional de *Ppchd* en presencia de varias cantidades de hierro suplementario se evaluó en un único experimento realizado en triplicado, y los resultados se muestran en la Figura 26 como medias y s.e.m. de la luminiscencia observada. Muestra que la actividad de esta actividad de promotor se suprimió en presencia de una molécula de fusión con Fc independientemente de la cantidad de hierro suplementado, mientras la molécula de fusión con Fc control no tuvo efecto.

El impacto de un intervalo de dosis de la molécula de fusión con Fc o la molécula de fusión con Fc control en la actividad transcripcional de *PpchD* se ensayó sin suplementar con hierro en 3 experimentos realizados en triplicado. En cada experimento, la cantidad de actividad luciferasa se normalizó respecto al control no tratado. Las medias y s.e.m. de la luminiscencia observada obtenida en estos 3 experimentos se muestran en la Figura 27. Los puntos se ajustaron a una curva de respuesta a la dosis estándar y rindieron un valor CI_{50} de 0,03 mg/mL (95% CI: 0,02 - 0,05) para la molécula de fusión con Fc y fue indefinido para la molécula de fusión con Fc de control isotópico.

Globalmente, estos resultados muestran que la molécula de fusión con Fc está previniendo específicamente la señal transducida normalmente por pioquelina unida a hierro en un medio desprovisto de hierro. Esto debería resultar en cantidades reducidas del sideróforo, como se observó con pioverdina. A la inversa, como se ha mostrado una regulación positiva similar de la síntesis de pioverdina por pioverdina en sí misma (Lamont et al., 2000, Proc Natl Acad Sci U S A, 99(10), p. 7072-7), es tentador especular que el impacto de la molécula de fusión con Fc en la producción de pioverdina observado anteriormente se debe al bloqueo de la señalización mediada por pioverdina. También se sabe que la señalización mediada por sideróforo produce un impacto en la síntesis de los factores de virulencia (Lamont et al., 2000, Proc Natl Acad Sci U S A, 99(10), p. 7072-7), y así se espera que la molécula de fusión con Fc afectará la virulencia.