

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 374**

51 Int. Cl.:
C07K 16/44 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05729289 .8**
96 Fecha de presentación: **24.03.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1730197**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2006**

54 Título: **Procedimiento para inducir autólisis en bacterias infecciosas**

30 Prioridad:
27.03.2004 GB 0407008

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2012

73 Titular/es:
HAPTOGEN LTD
POLWARTH BUILDING, FORESTERHILL
ABERDEEN AB25 2ZD, GB

72 Inventor/es:
CHARLTON, Keith Alan;
PORTER, Andrew Justin Radcliffe y
BROADBENT, Ian

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 381 374 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para inducir autólisis en bacterias infecciosas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para causar la autólisis de una población de bacterias gramnegativas. La desvelación prevé la aplicación de terapias basadas en moléculas receptoras de inmunoglobulinas o similares a inmunoglobulinas que tienen afinidad y especificidad por moléculas de señalización de acil homoserina lactona implicadas en los procesos de la comunicación bacteriana de célula a célula. Mediante la unión a dichas moléculas, los receptores pueden usarse para modular las concentraciones extracelulares de las moléculas implicadas en la sensibilidad al entorno y la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*, y al hacerlo pueden inducir un proceso de muerte celular rápida (autólisis) en las poblaciones bacterianas.

Antecedentes de la invención

15 Una de las principales causas de mortalidad y morbilidad entre los pacientes que están bajo tratamiento en los hospitales hoy en día es debida a infecciones nosocomiales. La susceptibilidad a dichas infecciones puede ser el resultado de una enfermedad primaria por la que el paciente fue hospitalizado, de regímenes de tratamientos inmunodepresores, o como consecuencia unas de lesiones que provocan daños graves en la piel, tales como quemaduras. La bacteria a la cual se atribuyen la mayoría de los casos es *Pseudomonas aeruginosa*. Es el arquetipo del patógeno oportunista en seres humanos. La bacteria no infecta prácticamente nunca tejidos sanos, aunque no hay ningún tejido que no pueda infectar si las defensas tisulares están comprometidas de alguna manera. Aunque supone un número de especies relativamente pequeño, presenta una seria amenaza para la salud humana y se usa a continuación como un ejemplo representativo de una bacteria infecciosa, y no limita en modo alguno el ámbito o la extensión de la presente invención.

25 *Ps. aeruginosa* es un patógeno oportunista que provoca infecciones del tracto urinario, infecciones del sistema respiratorio, dermatitis, infecciones de tejidos blandos, bacteriemias y diversas infecciones sistémicas, particularmente en las víctimas de quemaduras severas, y en pacientes oncológicos y con SIDA que están inmunodeprimidos. Las infecciones respiratorias provocadas *Ps. aeruginosa* se producen prácticamente exclusivamente en individuos con un tracto respiratorio inferior comprometido o con un mecanismo de defensa sistémica comprometido. La neumonía primaria se produce en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas e insuficiencia cardíaca congestiva. La neumonía bacteriémica se produce habitualmente en pacientes oncológicos neutropénicos bajo tratamiento con quimioterapia. La colonización del tracto respiratorio inferior de pacientes con fibrosis quística por cepas mucoides de *Ps. aeruginosa* es habitual y difícil, si no imposible, de tratar. Provoca una bacteriemia principalmente en pacientes inmunodeprimidos. Las condiciones predisponentes incluyen enfermedades hematológicas malignas, inmunodeficiencia relacionada con el SIDA, neutropenia, *diabetes mellitus* y quemaduras graves. La mayoría de las bacteriemias por *Pseudomonas* se adquieren en los hospitales y clínicas, lo que supone aproximadamente el 25 por ciento de todas las bacteriemias gramnegativas nosocomiales.

35 La bacteria es conocida por su resistencia natural a muchos antibióticos debido a la barrera de permeabilidad proporcionada por sus LPS de la membrana exterior, y por lo tanto, es un patógeno particularmente peligroso y temible. También, su tendencia a colonizar superficies en forma de biopelícula hace que las células sean impermeables a las concentraciones terapéuticas de antibióticos. Dado que su hábitat natural es el suelo, al vivir en asociación con bacilos, actinomicetos y mohos, ha desarrollado resistencia a varios de sus antibióticos naturales. Además, las especies de *Pseudomonas* mantienen plásmidos de resistencia a antibióticos, tanto factores de resistencia (*Resistance factors*, R-factors) como factores de transferencia de la resistencia (*Resistance Transfer Factors*, RTFs), y son capaces de transferir estos genes mediante procesos bacterianos de transducción y conjugación. Sólo unos pocos antibióticos son eficaces frente a *Pseudomonas*, incluyendo fluoroquinolona, gentamicina e imipenem, e incluso estos antibióticos no son eficaces frente a todas las cepas. Se ha informado de que las combinaciones de gentamicina y carbenicilina son eficaces en pacientes con infecciones agudas por *Ps. aeruginosa*. La futilidad del tratamiento de infecciones por *Pseudomonas* con antibióticos se ilustra más significativamente en pacientes con fibrosis quística, prácticamente todos los cuales se infectan con una cepa que es tan resistente que no puede ser tratada. Debido a la resistencia a los antibióticos, son obligatorias las pruebas de susceptibilidad de las cepas clínicas.

50 *Ps. aeruginosa* puede aislarse habitualmente a partir de suelo y agua, así como de superficies de plantas y animales. Se encuentra en todo el mundo, en cualquier sitio en el que aparezcan estos hábitats, por lo que es una bacteria bastante "cosmopolita". A veces está presente como parte de la flora normal de seres humanos, aunque la prevalencia de la colonización de individuos sanos fuera del hospital es relativamente baja (se estima en el intervalo de desde el 0 al 24 por ciento, dependiendo de la localización anatómica). Se sabe que en los hospitales colonizan los alimentos, lavabos, grifos, fregonas, equipos de respiración e instrumentos quirúrgicos. Aunque la colonización precede habitualmente a las infecciones por *Ps. aeruginosa*, a menudo no están claras la fuente exacta y la forma de transmisión del patógeno debido a su presencia ubicua en el entorno. De entre los pacientes de cuidados intensivos en los que se sospecha infección por signos clínicos, tantos como el 50% no tienen una fuente identificable de infección. Actualmente hay 1.400 muertes en todo el mundo provocadas cada día por *Ps. aeruginosa*

en unidades de cuidados intensivos (UCI), lo que le hace el asesino N° 1.

Ps. aeruginosa es principalmente un patógeno nosocomial. Según los CDC, la incidencia global de las infecciones por *Ps. aeruginosa* en los hospitales de EE.UU. supone aproximadamente el 0,4 por ciento (4 de cada 1.000 descargas), y la bacteria es el cuarto patógeno nosocomial más comúnmente aislado, suponiendo el 10,1% de todas las infecciones nosocomiales. Globalmente es responsable del 16% de los casos de neumonía nosocomial, del 12% de las infecciones adquiridas del tracto urinario, del 8% de las infecciones de heridas quirúrgicas y del 10% de las septicemias. Los pacientes inmunodeprimidos, tales como los pacientes oncológicos neutropénicos y los trasplantados de médula ósea, son susceptibles a la infección oportunista por *Ps. aeruginosa*, produciendo el 30% de las muertes declaradas. También es responsable del 38% de las neumonías asociadas a ventilación mecánica y del 50% de las muertes entre pacientes de sida. En los casos de quemaduras, las infecciones por *Ps. aeruginosa* han disminuido en los últimos años debido a una mejora en los tratamientos y a cambios en la dieta. Las tasas de mortalidad permanecen sin embargo elevadas, suponiendo el 60% de todas las muertes debidas a una infección secundaria en pacientes con quemaduras.

Una razón de la versatilidad de *Ps. aeruginosa* es que produce un conjunto diverso de determinantes de virulencia que incluyen elastasa, proteasa LasA, proteasa alcalina, ramnolípido, motilidad por espasmos mediada por pilus de tipo IV, pioverdina (Williams y col., 1996, Stintzi y col., 1998, Glessner y col., 1999), piocianina (Brint & Ohman, 1995, Reimmann y col., 1997) y las lectinas citotóxicas PA-I y PA-II (Winzer y col., 2000). Ahora se sabe que muchos de estos determinantes de virulencia están regulados a nivel genético de una forma dependiente de la densidad a través de autoinducción. *Ps. aeruginosa* posee dos sistemas de autoinducción bien caracterizados, a saber, los sistemas *las* y *rhl* (*vsm*), que forman parte de los homólogos de LuxRI LasRI (Gambello & Iglewski, 1991) y RhlRI (VsmRI) (Latifi y col., 1995), respectivamente. LasI dirige la síntesis de 3-oxo-C12-HSL (Passador y col., 1993, Pearson y col., 1994), mientras que RhlI dirige la síntesis de C4-HSL (Winson y col., 1995). Se cree que los sistemas *las* y *rhl* existen en una jerarquía en la que el sistema *las* ejerce el control transcripcional sobre RhlR (Williams y col., 1996, Pesci y col., 1997). El activador de la transcripción LasR funciona junto 3-oxo-C12-HSL para regular la expresión de los genes que codifican para los determinantes de virulencia elastasa, proteasa LasA, proteasa alcalina y exotoxina A (Gambello & Iglewski, 1991, Toder y col., 1991, Gambello y col., 1993, Pearson y col., 1994) así como *lasI*. La elastasa es capaz de escindir el colágeno, los anticuerpos IgG e IgA, el complemento, y facilita la adhesión bacteriana sobre la mucosa pulmonar. En combinación con la proteasa alcalina también provoca la inactivación del interferón gamma (INF) y el factor de necrosis tumoral (*Tumour Necrosis Factor*, TNF). LasI dirige la síntesis de 3-oxo-C12-HSL, que junto con LasR, se une al promotor *lasI* y crea un sistema de retroalimentación positiva. El activador de la transcripción RhlR, junto con su análogo AHL (C4-HSL), regula la expresión de *rhlAB* (ramnolípido), *lasB*, *aprA*, RpoS, cianuro, piocianina y las lectinas PA-I y PA-II (Ochsner y col., 1994, Brint & Ohman, 1995, Latifi y col., 1995, Pearson y col., 1995, Winson y col., 1995, Latifi y col., 1996, Winzer y col., 2000). Éstos existen de forma jerárquica, mediante lo que LasR/3-oxo-C12-HSL regula *rhlR* (Latifi y col., 1996, Pesci y col., 1997) y consecuentemente, se requieren ambos sistemas para la regulación de todos los determinantes de virulencia anteriores.

Más recientemente se ha identificado otra clase de molécula de señalización implicada en los sistemas de autoinducción de *Ps. aeruginosa*. Estos son un grupo de moléculas relacionadas basadas en 4-hidoxi-2-alquilquinolinas (HAQ's), muchas de las cuales muestran actividad antibacteriana. Inicialmente identificada en 1959, y posteriormente caracterizada (Pesci y col., 1999), la 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolina se denominó PQS (*Pseudomonas quinolone signal*, señal de quinolona de *Pseudomonas*) por su papel en la autoinducción. Investigaciones posteriores han revelado las estructuras de una serie de HAQ's que son sintetizadas y secretadas por *Ps. aeruginosa*, algunas de las cuales también están implicadas en los sistemas de comunicación de célula a célula. Se cree que una de éstas, la 2-heptil-4-hidoxiquinolona (HHQ) es secretada por las células durante la fase de crecimiento, recogida por las células adyacentes y convertida en PQS en una fase de crecimiento tardío/estacionaria temprana, y subsiguientemente es liberada como una molécula de señalización a lo largo de la fase estacionaria (Déziel y col., 2004). Esto coincide con la producción de varios factores de virulencia regulados por autoinducción, tales como piocianina y elastasa (Diggle y col., 2003). La confirmación de la implicación de la PQS se obtuvo a partir de la observación de que la adición de PQS exógena al medio de crecimiento durante la fase de crecimiento temprana daba como resultado una producción temprana de estos factores de virulencia. El hecho de que se encuentren picos de niveles exógenos de PQS en la fase estacionaria tardía sugiere que no está implicada en la detección de la densidad celular.

La actividad de la PQS está muy estrechamente relacionada con el anteriormente descrito sistema de autoinducción de *Ps. aeruginosa*. Su síntesis está regulada por *las* y *rhl*, siendo la primera la responsable de la inducción de la PQS, y el último sistema capaz de reprimir la PQS (McGrath y col., 2004). Además, también se ha encontrado que la producción de la PQS es dependiente de la proporción de moléculas de señalización AHL producidas por los otros sistemas, es decir, 3-oxo-C12-HSL y C4-HSL. La PQS es capaz de estimular la producción del factor de virulencia elastasa, y también induce la expresión de *rhlI*, que a su vez codifica para la sintasa de C4-HSL (McKnight y col., 2000). Adicionalmente, la bioactividad de la PQS depende de la presencia de RhlR (Pesci y col., 1999), y se observa por lo tanto como un componente importante de la regulación jerárquica de la autoinducción.

Una de las dolencias clínicas más graves inducida por *Ps. aeruginosa* es la infección pulmonar crónica destructiva de los pacientes de fibrosis quística (FQ). Prácticamente todos los pulmones de los pacientes están infectados a la

edad de tres años (Burns y col., 2001). Los sistemas inmunitarios de los pacientes de FQ son incapaces de eliminar la bacteria, dando como resultado el establecimiento de una enfermedad crónica con el asociado amplio daño tisular y bloqueo de las vías respiratorias por el que finalmente sucumben la mayoría de los pacientes. El establecimiento y la persistencia de la infección pulmonar por *Ps. aeruginosa* se ha asociado durante mucho tiempo con el desarrollo de un fenotipo en biopelícula, además de la inducción de otros factores de virulencia regulados por la autoinducción (Singh y col., 2000). Las señales de autoinducción se detectan fácilmente en los pulmones de ratones con FQ infectados (Wu y col., 2000). De entre otros efectos, la producción de las bien caracterizadas moléculas de señalización AHL por parte de *Ps. aeruginosa* en el pulmón puede afectar directamente a las respuestas inmunitarias del hospedador, modulando la proporción de isotipos de la respuesta de anticuerpos y los niveles de citocinas (Wu y col., 2004).

Un estudio reciente de mutantes creados a partir de la cepa clínica de *Ps. aeruginosa* PA01 identificó cepas que experimentaron autólisis (muerte celular programada) en condiciones de alta densidad celular (D'Argenio y col., 2002). El análisis detallado de varias de estas cepas reveló que todas contenían mutaciones que dieron como resultado la sobreproducción de la señal de autoinducción PQS. La subsiguiente introducción de una segunda mutación que redujera los niveles de la PQS secretada restableció el fenotipo natural (es decir, evitó o redujo ampliamente la autólisis), confirmando así la implicación de la PQS en la muerte celular observada. (Guina y col., 2003) informan de que la producción de PQS por *Ps. aeruginosa* también puede ser inducida por el crecimiento en un medio limitante de magnesio. Junto con la expresión de otros genes de respuesta al estrés, la síntesis de PQS en un medio con poco magnesio indica una respuesta a la inanición. Estas condiciones serían similares a las encontradas en entornos de hospedadores pulmonares, la inducción de factores de virulencia ayudaría a la bacteria a luchar contra el sistema inmunitario del hospedador. El efecto de autólisis observado por D'Argenio y col., cuando la mayoría, pero no todas las células, murieron, resultó de una producción excesiva más que regulada de PQS, y podría mimetizar una respuesta extrema a condiciones adversas. En dichas situaciones, beneficiaría a la bacteria al reducir significativamente sus cifras con objeto de permitir la supervivencia de unas pocas (D'Argenio y col., 2002).

Se están persiguiendo activamente numerosas metodologías para desarrollar terapéuticas para el tratamiento o la prevención de la infección por *Ps. aeruginosa*. Algunas están destinadas a ser de amplio espectro, mientras que otras están dirigidas a tipos específicos de infección por *Pseudomonas*. Aquellas que siguen las rutas tradicionales incluyen el desarrollo de vacunas tales como la descrita en la patente de EE.UU. 6.309.651, y un nuevo fármaco antibiótico (SLIT) del que se espera que sea eficaz frente a bacterias gramnegativas en general, pero que principalmente está diseñado para actuar contra *Ps. aeruginosa* y que se administra mediante inhalación en aerosol. Otra observación adicional en investigación es que el antibiótico eritromicina, administrado a concentraciones subóptimas inhibitorias del crecimiento, suprime simultáneamente la producción de hemaglutininas, hemolisina, proteasas y acil-homoserina lactonas de *Ps. aeruginosa*, y puede ser aplicable para el tratamiento de infecciones persistentes por *Ps. aeruginosa*. Las formulaciones en crema que contienen péptidos anfipáticos también se están examinando como un posible medio para prevenir la infección de quemaduras y otras heridas cutáneas graves. La patente de EE.UU. 6.309.651 también enseña que anticuerpos contra la proteína de virulencia PcrV de *Ps. aeruginosa* pueden proporcionar protección frente a la infección.

También existe cierto interés en la modulación de los niveles de homoserina lactona como un medio para controlar la patogenicidad. Se ha demostrado que ciertas algas producen inhibidores competitivos de las acil-homoserina lactonas tales como las furanonas (Manefield, 1999), que tienen algunas plantas terrestres. Estos compuestos desplazan la molécula de señalización AHL de su receptor y pueden actuar como agonista o antagonista en bioensayos de AHL (Tepletski y col., 2000). Otros procedimientos empleados para reducir la concentración de AHL incluyen al desarrollo de enzimas de inactivación autoinductoras (AiiA's) que catalizan la degradación de las AHLs y el secuestro de las AHL por los anticuerpos (documento WO 2004/014423).

Existen varios problemas potenciales y limitaciones asociados con las terapias actualmente en desarrollo. Aún no se ha comprobado si las vacunas serán tratamientos eficaces. *Ps. aeruginosa* produce una amplia cápsula mucoide que protege de forma eficaz contra la opsonización por los anticuerpos del hospedador, según se revela en pacientes con infecciones persistentes que tienen altos títulos séricos de anticuerpos anti-*Pseudomonas*. El uso de miméticos autoinductores está limitado por las concentraciones de la mayoría, que son requeridas para competir eficazmente contra las AHLs por el sitio de unión al receptor, y la posibilidad de efectos secundarios. Es bien conocido que las AHLs liberadas por *Pseudomonas* y otras bacterias tienen varios efectos directos sobre la fisiología humana. Estos incluyen la inhibición de la liberación de histamina, según se describe en el documento WO 01/26650. El documento WO 01/74801 describe que las AHLs también son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos y de regular por disminución la secreción de TNF- α por monocitos y macrófagos, actuando así como un inmunodepresor general. Existe por lo tanto un peligro de que las terapias que implican el uso de miméticos competitivos de AHL pueden dar como resultado una regulación por disminución del sistema inmunitario del paciente. Esto sería generalmente indeseable, y particularmente lo sería en los pacientes inmunocomprometidos. El uso de antibióticos puede, como mucho, contemplarse como una estrategia a corto plazo en vista de la notable capacidad de esta bacteria (y de otras) de desarrollar resistencia a los antibióticos.

El hecho de que la patogenia de *Ps. aeruginosa* es claramente multifactorial está subrayado por el amplio número de factores de virulencia y el amplio espectro de enfermedades asociadas con esta bacteria. Muchos de los factores de virulencia extracelulares requeridos para la invasión tisular y la diseminación están controlados por sistemas de

señalización de célula a célula que implican moléculas de señalización basadas en homoserina lactona y PQS, y proteínas específicas activadoras de la transcripción. Estos sistemas reguladores permiten que *Ps. aeruginosa* se adapte a una forma virulenta de una forma coordinada dependiente de la densidad celular, y supere los mecanismos de defensa del hospedador. También se usan para regular la población de bacterias y para reducir específicamente las cifras bacterianas, en condiciones en las que hay nutrientes esenciales limitantes, de forma que las bacterias remanentes tienen una ventaja de supervivencia. La interferencia con dichos sistemas de señalización celular con objeto de inducir la autólisis es una metodología terapéutica prometedora para reducir las enfermedades y las muertes provocadas por *Ps. aeruginosa*.

La solicitud de patente internacional publicada como WO 04/014423 describe procedimientos para el control de la virulencia de bacterias infecciosas modulando la concentración extracelular de moléculas de señalización celulares bacterianas. Mediante la unión de las moléculas de señalización, los receptores reducen y mantienen las concentraciones extracelulares de las moléculas de señalización por debajo del nivel umbral que de otro modo darían como resultado que ciertos patógenos oportunistas adoptaran una forma virulenta, y pueden transformar organismos virulentos en estados no virulentos.

La patente de EE.UU. nº 6.395.282 describe conjugados inmunógenos de moléculas autoinductoras de bacterias gramnegativas. Cuando los conjugados inmunógenos se combinan con un portador farmacéuticamente aceptable, forman una vacuna adecuada para mamíferos para prevenir la infección por bacterias gramnegativas.

Existe la necesidad de desarrollar un medio eficaz de modular las concentraciones de HSL y otras moléculas de señalización de las células bacterianas implicadas en la patogenia mediante procedimientos que no tengan efectos secundarios adversos, y que sea improbable que sean evadidos por las bacterias patógenas en un futuro inmediato. Una composición o compuesto capaz de destruir bacterias, particularmente *Pseudomonas aeruginosa*, que no ataque directamente a la célula bacteriana, y por lo tanto es improbable que conduzca a cepas resistentes, tendría un beneficio considerable para el tratamiento de estados patológicos tales como la FQ. La presente invención prevé dichas composiciones.

Resumen de la invención

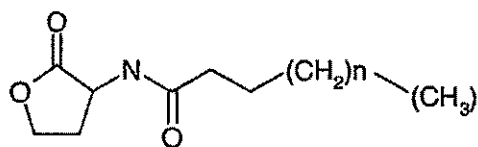
La presente invención prevé procedimientos para reducir las cifras de la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa* regulando las concentraciones extracelulares de moléculas de señalización celular bacteriana. Mediante la eliminación selectiva (unión o degradación) de moléculas de señalización celular derivadas de lactona, se produce un desequilibrio entre las proporciones de las moléculas de señalización AHL y PQS que estimula una muerte celular rápida (o autólisis) de *Ps. aeruginosa*. Alternativamente, pueden administrarse las PQS solas o junto con receptores anti-AHL. Mientras que otros tratamientos bactericidas actúan directamente sobre la célula para causar la muerte, la presente invención se dirige a las moléculas de señalización extracelular con objeto de mimetizar un entorno incapaz de sostener dichas elevadas densidades poblacionales, e inducir por tanto un colapso en las cifras celulares bacterianas. Como tal, es mucho menos probable que surjan cepas resistentes a la terapia.

Los aspectos de la invención se establecen en las reivindicaciones.

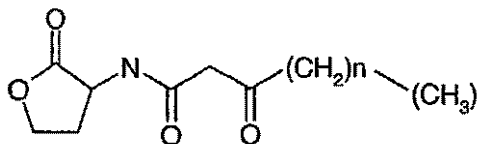
Según un primer aspecto de la presente invención, se prevé un procedimiento *in vitro* para provocar la autólisis de una población de bacterias gramnegativas, comprendiendo dicho procedimiento la administración a la población de un anticuerpo contra una lactona o una molécula de señalización derivada de la lactona secretada por las bacterias gramnegativas, de forma que se provoque un desequilibrio en la proporción de la molécula de señalización de homoserina lactona (HL) y la molécula de señalización de señal de quinolona (QS) en el entorno de la población de bacterias gramnegativas.

Las bacterias gramnegativas pueden ser *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Acinetobacter baumannii*, *Bordetella pertussis*, *Brucella* sp., *Campylobacter* sp., *Capnocytophaga* sp., *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Kingella kingae*, *Legionella pneumophila*, *Pasteurella multocida*, *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* sp., *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella* sp., *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*, *Veillonella* sp., *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides* sp., *Prevotella* sp., *Fusobacterium* sp., *Spirillum minus*, *Aeromonas* sp., *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Acinetobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Xanthomonas maltophilia* o *Stenotrophomonas maltophilia*. En una forma de realización preferida, la bacteria gramnegativa es *Pseudomonas aeruginosa*.

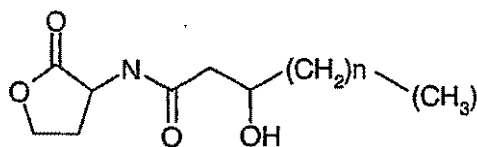
Adecuadamente, la molécula de señalización de homoserina lactona (HL) puede ser una molécula de homoserina lactona con una fórmula elegida del grupo que consiste en:



Fórmula (I)



Fórmula (II)



Fórmula (III)

5

en las que n puede ser desde 0 hasta 12.

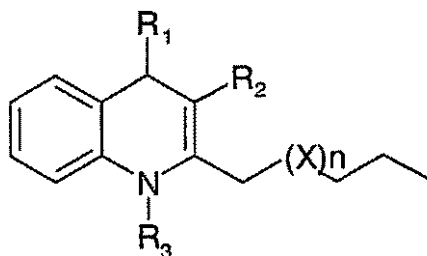
La molécula de homoserina lactona de fórmula general (I) puede ser *N*-butanoil-L-homoserina lactona (BHL) en la que n = 0, *N*-dodecanoil-L-homoserina lactona (dDHL), en la que n = 8 o *n*-tetradecanoil-L-homoserina lactona (tDHL) en la que n = 10.

- 10 La molécula de homoserina lactona de fórmula general (II) puede ser *N*-(-3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (OdDHL) en la que n = 8 o *N*-(-3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (OHHL) en la que n = 2.

La molécula de homoserina lactona de fórmula general (III) puede ser *N*-(-3-hidroxi-butanoil)-L-homoserina lactona (HBHL) en la que n = 0.

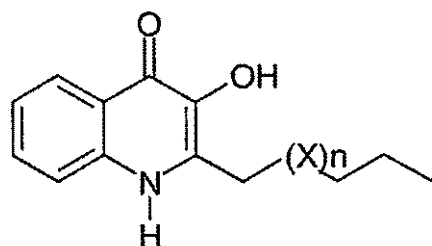
- 15 La molécula de señalización de lactona puede ser cualquier molécula de señalización de acil-homoserina, y preferiblemente es OdDHL y/o BHL.

La molécula de señalización de señal de quinolona (QS) puede ser una molécula fórmula general (IV)



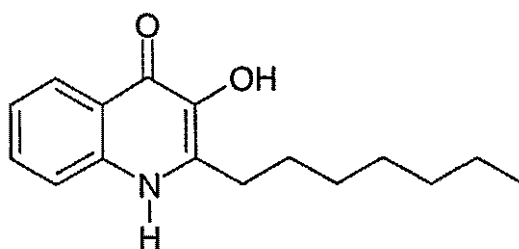
- 20 en la que n puede ser desde 1 hasta 7,
 R1 puede ser =O, o -H,
 R2 puede ser -OH, o -H, y
 R3 puede ser -H, o alternativamente, el átomo de nitrógeno (N) puede no estar sustituido, en cuyo caso el anillo aromático está adicionalmente insaturado.

- 25 Adecuadamente, la molécula de señalización de quinolona de fórmula general (IV) puede ser



2-acyl-3-hidroxi-4-quinolona

Preferiblemente, la molécula de QS es la señal de quinolona de *Pseudomonas* (PQS) o 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona



2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona

5

En una forma de realización de la invención, la bacteria gramnegativa puede ser *Pseudomonas aeruginosa* y la proporción entre las moléculas de señalización bacteriana puede ser entre la molécula de señalización de acil-homoserina lactona (AHL) de fórmula (I) y la molécula de señalización de quinolona de *Pseudomonas* (PQS).

10 Se está encontrando que un número creciente de especies bacterianas se comunican entre las células usando una variedad de pequeñas moléculas de señalización. Las bacterias gramnegativas usan predominantemente N-acil homoserina lactonas. Estas últimas son un grupo de compuestos que comparten una estructura anular común de homoserina lactona y varían en la longitud y la estructura de una cadena lateral. Estas son tres clases dentro del grupo, las acil-homoserina lactonas, las 3-oxo-homoserina lactonas y las 3-hidroxi-homoserina lactonas. Una única especie puede producir y responder a miembros de más de una clase. *Pseudomonas aeruginosa* usa N-butilil-homoserina lactona (BHL), 3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona (OdDHL) y la señal de quinolona de *Pseudomonas* 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS).

15 Las células usan las moléculas como un medio para determinar la densidad celular local, de forma que en condiciones de una baja densidad celular, la concentración de la molécula de señalización es correspondientemente baja. En densidades celulares altas, la concentración de la molécula de señalización local es alta. Cuando ésta concentración alcanza un nivel umbral, induce la transcripción de genes implicados en la virulencia y el establecimiento de un estado patológico en el hospedador.

20 Se están descubriendo moléculas de señalización bacteriana en cualquier organismo en el que se están buscando. Parece ser un sistema ubicuo, aplicable a cualquier especie. Las principales diferencias son que todas las bacterias gramnegativas (gram -ve) usan moléculas basadas en homoserina lactona, y las bacterias grampositivas (gram +ve) usan pequeños péptidos (modificados). *Ps. aeruginosa* es un ejemplo de una bacteria gramnegativa que usa dos moléculas de señalización, AHL y PQS.

25 El trabajo previo en este campo se ha concentrado en mimetizar las moléculas de señalización con unas que sean reconocidas pero que no funcionen, es decir, que no haya un cambio patógeno, o en bloquear los diversos sistemas receptores. Los inconvenientes de estos procedimientos son principalmente que puede desarrollarse resistencia al mimético o al bloqueo, y la molécula de señalización "real" todavía está ahí y competirá por la unión. Además, algunas moléculas de señalización bacteriana, por ejemplo, las acil-homoserina lactonas, son factores de virulencia por derecho propio, y pueden causar directamente una inmunodepresión en el hospedador (es decir, el paciente).

30 La presente invención prevé procedimientos que usan anticuerpos que se dirigen a la molécula de señalización real en lugar de a la propia célula. Esta metodología tiene una ventaja clave e importante sobre los demás esfuerzos previos en el campo ya que las bacterias no reconocerán que están siendo atacadas, simplemente detectarán que están solas. No habrá ninguna presión selectiva de resistencia. Los aspectos de la presente invención son adicionalmente ventajosos porque son capaces de provocar la destrucción bacteriana induciendo un sistema endógeno de muerte celular programada. Un tratamiento bactericida que no se dirija directamente a las células

bacterianas representa una novedad con respecto a las medicaciones existentes.

Los anticuerpos según la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos policlonales pueden crearse estimulando su producción en un hospedador animal adecuado (por ejemplo, un ratón, una rata, una cobaya, un conejo, una oveja, un pollo, una cabra o un mono) cuando se inyecta el antígeno en el animal. Si es necesario puede administrarse un coadyuvante junto con el antígeno. Los anticuerpos pueden purificarse entonces en virtud de su unión al antígeno o según se describe adicionalmente a continuación. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse a partir de hibridomas. Éstos pueden formarse fusionando células de mieloma y células de linfocitos B que producen el anticuerpo deseado con objeto de formar una línea celular inmortal. Esta es la bien conocida técnica de Kohler & Milstein (Nature 256, 52-55 (1975)).

Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales y policlonales que se unen a una proteína en particular están ahora bien desarrolladas en la técnica. Se discuten en libros de texto de inmunología estándar, por ejemplo, en Roitt y col., Immunology segunda edición (1989), Churchill Livingstone, Londres.

Además de anticuerpos completos, la presente invención incluye derivados de los mismos que son capaces de unirse al antígeno. Por lo tanto, la presente invención incluye fragmentos de anticuerpos y constructos sintéticos. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpos y constructos sintéticos los proporcionan Dougall y col. en Tibtech 12, 372-379 (septiembre de 1994). Los fragmentos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fv (véase Roitt y col. [supra]). Los fragmentos Fv pueden modificarse para producir un constructo sintético conocido como una molécula de cadena única de (scFv). Ésta incluye un péptido conector que une covalentemente las regiones VH y VL que contribuyen a la estabilidad de la molécula. La presente invención se extiende por lo tanto también a anticuerpos de cadena única o scAbs.

Otros constructos sintéticos incluyen péptidos CDR. Estos son péptidos sintéticos que comprenden determinantes de unión al antígeno. También pueden usarse péptidos miméticos. Estas moléculas son habitualmente anillos orgánicos restringidos conformacionalmente que mimetizan la estructura de un bucle CDR y que incluyen cadenas laterales de interacción con el antígeno. Los constructos sintéticos también incluyen moléculas quiméricas. Así, por ejemplo, los anticuerpos humanizados (o primatizados) o los derivados de los mismos están en el ámbito de la presente invención. Un ejemplo del anticuerpo humanizado es un anticuerpo con regiones variables humanas, pero con regiones hipervariables de roedor. Los constructos sintéticos también incluyen moléculas que comprenden una fracción unida covalentemente que proporciona a la molécula alguna propiedad deseable además de la unión al antígeno. Por ejemplo, la fracción puede ser un marcador (por ejemplo, un marcador detectable, tal como un marcador fluorescente o radiactivo) o un agente farmacéuticamente activo.

Con objeto de generar anticuerpos anti-moléculas de señalización bacterianas, es preferible conjugar la molécula objetivo, o un derivado adecuado, con dos moléculas portadoras diferentes (proteínas), aunque también puede usarse una única especie conjugada. Las moléculas de señalización bacterianas son, en general, demasiado pequeñas para estimular una respuesta inmune *in vivo*, o para ser usadas directamente como fuente de antígeno para la selección de anticuerpos de alta afinidad a partir de genotecas de anticuerpos. La selección de anticuerpos específicos para la molécula de señalización celular (denominada en lo sucesivo "antígeno") se lleva a cabo en la forma de realización preferida usando un repertorio (genoteca) de los primeros miembros de pares de unión específicos (*specific binding pairs*, sbp), por ejemplo, una genoteca de anticuerpos expresada sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos. Cualquier otro sistema que permita la selección de receptores específicos a partir de una genoteca de receptores también es aplicable para los procedimientos de la presente invención. En formas de realización alternativas pueden seleccionarse clones específicos de moléculas de señalización a partir de un grupo de líneas celulares de hibridomas secretoras de anticuerpos generadas a partir de un animal inmunizado con un conjugado antigénico. Con el propósito de una ilustración general, se usará el ejemplo de una genoteca de sitios de unión a anticuerpos expresada sobre partículas de fagos.

Se inmoviliza un conjugado que comprende un antígeno acoplado a una molécula portadora adecuada, que puede ser una proteína, un péptido o cualquier compuesto o material natural o sintético (denominado en lo sucesivo "conjugado-1"), sobre un soporte sólido adecuado tal como un "inmunotubo" o una placa de microtitulación, y la superficie no recubierta se bloquea con un agente bloqueante no específico tal como leche en polvo. Las moléculas conjugadas adecuadas pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas tales como albúmina sérica bovina (*bovine serum albumin*, BSA), hemocianina de lapa californiana (*Keyhole Limpet Haemocyanin*, KLH), tiroglobulina bovina (*Bovine Thyroglobulin*, TG), ovoalbúmina (Ova), o moléculas no proteicas tales como biotina. La única restricción sobre la selección de la molécula conjugada es que debe ser inmovilizable de algún modo, y que sea lo suficientemente grande para que la inmunización desencadene una respuesta inmunitaria.

Se aplica una genoteca de los primeros miembros de pares de unión específicos (sbp's) ("la genoteca") al conjugado inmovilizado y se incuba durante un tiempo suficiente para que los miembros de los sbp reconozcan el conjugado-1 al que se van a unir. Los fagos que no reconozcan el conjugado se eliminan mediante un lavado en condiciones rigurosas. Los fagos que permanecen unidos se eluyen, por ejemplo, con trietilamina u otro reactivo adecuado, en una disolución tampón para restaurar el pH neutro. Entonces las partículas de fagos recuperadas se infectan en un organismo hospedador adecuado, por ejemplo, la bacteria *E. coli*, y se cultivan para amplificar las cifras de cada miembro seleccionado y generar así una segunda genoteca "enriquecida". Entonces se repite el proceso usando la

genoteca enriquecida para seleccionar los fago-anticuerpos ("fago") que reconocen el antígeno conjugado con una segunda proteína portadora (conjugado-2).

Se realizan tantas rondas adicionales como se requiera, alterando el proceso de selección para favorecer la selección de aquellos miembros de los sbp que reconocen la forma libre del antígeno. Los fagos se seleccionan frente a conjugados de antígenos según se describió previamente, usando inicialmente el conjugado-1, y alternando con el conjugado-2 (donde esté disponible) para cada ronda subsiguiente. Los fagos unidos se eluyen incubando con una disolución de antígeno libre, o de antígeno conjugado con pequeñas fracciones solubles seleccionables, por ejemplo, biotina, durante el tiempo suficiente para que los miembros de los sbp con mayor afinidad por la forma unida al antígeno se disocien del conjugado inmovilizado. Aquellos fagos eluidos con el antígeno libre son infectados en células de *E. coli* para la amplificación y la reselección, y aquellos que permanecen unidos al antígeno inmovilizado se descartan. Alternativamente, pero menos preferiblemente, pueden eluirse todos los anticuerpos que se unen al conjugado, por ejemplo, con un pH bajo.

Los clones de fagos individuales (monoclonales) de cada ronda de selección se criban buscando las características de unión deseadas. Esto puede realizarse mediante varios procedimientos que serán familiares para los expertos habituales en la materia, dependiendo de los requisitos, incluyendo técnicas tales como SPR (*Surface Plasmon Resonance*, resonancia de plasmón superficial) y ELISA (*Enzyme Linked Immuno-Sorbant Assay*, enzimoanálisis de adsorción). Los criterios de selección incluirán la capacidad de unirse preferiblemente a la forma soluble libre del antígeno en presencia de derivados conjugados.

En la forma de realización preferida de la invención, los anticuerpos se generarán a partir de una genoteca de expresión de fagos de anticuerpos humanos intactos (McCafferty y col., *Nature* 348: 552-554, 1990; y según se describe en el documento WO 92/01047). Por lo tanto, los anticuerpos pueden usarse para administrarlos a pacientes sin desencadenar una respuesta inmunitaria. En otras formas de realización puede construirse una genoteca a partir de un animal preinmunizado con uno o más conjugados de una AHL y una molécula portadora adecuada. Una alternativa adicional es la generación de líneas celulares de hibridoma a partir de un animal inmunizado, según se describió anteriormente. En los dos últimos casos es preferible que las etapas se realicen para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos resultantes, por ejemplo, creando anticuerpos quiméricos animal hospedador-humano, o "humanización" mediante un injerto CDR en un adaptador variable de anticuerpos adecuado. Otros procedimientos aplicables incluirán la identificación de potenciales epítomos de linfocitos T en el anticuerpo, y la subsiguiente eliminación de estos, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida (desinmunización). En una forma de realización adicional, el anticuerpo puede modificarse para que incluya regiones constantes procedentes de diferentes clases de inmunoglobulinas humanas (IgG, IgA, etc.) y producirse como una molécula de anticuerpo completo en células animales. En particular, estas metodologías son deseables cuando los anticuerpos van a usarse terapéuticamente. El uso de anticuerpos del isotipo IgA secretora puede ser preferible cuando se contempla una aplicación intranasal/aerosol, por ejemplo, en el tratamiento de infecciones por *Ps. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística.

Para la presente invención, el anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Los anticuerpos pueden ser humanos o humanizados. Pueden usarse fragmentos o derivados de anticuerpos, tales como Fab, F(ab')₂ (escrito también como F(ab')₂), Fv o scFv, anticuerpos de cadena única (scAb) tal y como describen y Huston y col. (*Int. Rev. Immunol.* 10: 195-217, 1993), anticuerpos de dominio (dAbs), por ejemplo, un anticuerpo de dominio individual, o receptores de unión al antígeno de dominio individual de tipo anticuerpo. Además de anticuerpos, pueden diseñarse fragmentos de anticuerpos y moléculas de tipo inmunoglobulinas, peptidomiméticas o no peptidomiméticas, para mimetizar la actividad de unión de anticuerpos e inducir la lisis celular bacteriana (muerte celular rápida) modulando la proporción extracelular de moléculas de señalización bacterianas, adecuadamente la proporción entre moléculas de señalización AHL y PQS.

En ciertas formas de realización preferidas de la invención, los anticuerpos son scAbs, en particular scAbs que se obtienen a partir de clones de *E. coli* denominados XL1-Blue G3H5, G3B12, G3G2 y/o G3H3. Los clones se han depositado en NCIMB, Aberdeen, Reino Unido, el 18 de marzo de 2003 bajo los términos del Tratado de Budapest con los siguientes números de acceso: G3H5 depositado como NCIMB-41167, G3B12 depositado como NCIMB-41168, G3G2 depositado como NCIMB-41169 y G3H3 depositado como NCIMB-41170. Las cepas pueden cultivarse en un medio de crecimiento adecuado tal como un medio LB complementado con 100 µg/ml de ampicilina, opcionalmente complementado con 12,5 µg/ml de tetraciclina, y/o un 1% de glucosa, en condiciones estándar de 37°C al aire.

El anticuerpo G3B12 se denomina en lo sucesivo en este documento Hap 2 y el anticuerpo G3G2 se denomina en lo sucesivo en este documento Hap 5.

Tras la preparación de un anticuerpo adecuado, puede aislarse o purificarse mediante una de las diversas técnicas disponibles habitualmente (por ejemplo, según se describe en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)). Las técnicas adecuadas incluyen generalmente columnas de afinidad de péptidos o proteínas, HPLC o RP-HPLC, purificación en columnas de Proteína A o Proteína G, o combinaciones de estas técnicas. Los anticuerpos recombinantes pueden prepararse según procedimientos estándar, y ensayarse la especificidad usando procedimientos disponibles generalmente, que incluyen ELISA, ensayos dot-blot etc.

Los procedimientos de la presente invención proporcionan un medio mediante el cual puede inducirse un colapso masivo en la población bacteriana sin dirigirse realmente a la bacteria de forma directa, es decir, dirigiéndose a las moléculas de señalización extracelulares. Dicha metodología no tiene precedentes. La invención prevé una metodología de infección bacteriana que no conduce al desarrollo de resistencias en las bacterias.

- 5 La presente desvelación también proporciona un procedimiento para el tratamiento de una infección por bacterias gramnegativas en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la administración al sujeto de un anticuerpo contra una molécula de señalización de lactona o derivada de lactona secretada por bacterias gramnegativas, de forma que provoque un desequilibrio en la proporción entre la molécula de señalización de homoserina lactona (HL) y la molécula de señalización de señal de quinolona (QS) en el entorno de las bacterias gramnegativas. El tratamiento
10 puede ser profiláctico o con respecto a una dolencia existente.

En dichos procedimientos, el anticuerpo puede formularse como una composición farmacéutica según las técnicas conocidas en el campo de la medicina, por ejemplo, mezclando el principio activo con un(os) portador(es), diluyente(s) o excipiente(s) en condiciones estériles.

- 15 La composición farmacéutica puede estar adaptada para su administración mediante cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Dichas composiciones pueden prepararse mediante cualquier procedimiento conocido en la materia de farmacia, por ejemplo, mezclando el principio activo con el (los) portador(es) o excipiente(s) en condiciones estériles. Las
20 composiciones farmacéuticas adaptadas para su administración por vía oral pueden presentarse como unidades individuales tales como cápsulas o comprimidos; como polvos o gránulos; como disoluciones, jarabes o suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos; o como espumas o barritas comestibles; o como emulsiones).

- Los excipientes adecuados para comprimidos o cápsulas de gelatina dura incluyen lactosa, almidón de maíz o derivados de los mismos, ácido esteárico o sales de los mismos. Algunos excipientes adecuados para su uso con las cápsulas de gelatina blanda incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos o
25 líquidos, etc.

Para la preparación de disoluciones y jarabes, algunos excipientes que pueden usarse incluyen, por ejemplo, agua, polioles y azúcares. Para la preparación de suspensiones pueden usarse aceites (por ejemplo, aceites vegetales) para proporcionar suspensiones de aceite en agua o de agua en aceite.

- 30 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para su administración por vía transdérmica pueden presentarse como parches individuales destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo prolongado de tiempo. Por ejemplo, el principio activo puede administrarse desde el parche mediante iontoforesis según se describe de forma generalizada en *Pharmaceutical Research*, 3 (6), página 318 (1986).

- 35 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para su administración tópica pueden formularse como ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, disoluciones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles o aceites. Para infecciones de los ojos u otros tejidos externos, por ejemplo, boca y piel, las composiciones se aplican preferiblemente como un ungüento o una crema tópicos. Cuando se fórmula en un ungüento, el principio activo puede emplearse con una base de parafina o de ungüento miscible en agua. Alternativamente, el principio activo puede formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de agua en aceite. Las
40 composiciones farmacéuticas adaptadas para su administración tópica en el ojo incluyen gotas oculares en las que el principio activo está disuelto o suspendido en un portador adecuado, especialmente un disolvente acuoso. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para su administración tópica en la boca incluyen tabletas, pastillas y enjuagues orales. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para su administración rectal pueden presentarse como supositorios o enemas.

- 45 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para su administración nasal en la que el portador es un sólido incluyen un polvo grueso con un tamaño de partícula en el intervalo de, por ejemplo, 20 a 500 micrómetros, que se administra de forma que se toma una inspiración, es decir, mediante la inhalación rápida a través de las fosas nasales desde un recipiente del polvo sostenido cerca de la nariz. Las composiciones adecuadas en las que el portador es un líquido, para su administración como una pulverización nasal o como gotas nasales, incluyen disoluciones acuosas u oleosas del principio activo.

- 50 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para su administración mediante inhalación incluyen polvos o nieblas de partículas finas que pueden generarse mediante diversos tipos de aerosoles presurizados dosificadores, nebulizadores o insufladores.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para su administración vaginal pueden presentarse como óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones pulverizadas.

- 55 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para su administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la disolución sustancialmente isotónica con respecto a la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles

- 5 acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes suspensores y agentes espesantes. Los excipientes que pueden usarse para las disoluciones inyectables incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Las composiciones pueden presentarse en recipientes unidos y multidosis, por ejemplo, ampollas y viales precintados, y pueden almacenarse en estado liofilizado, que únicamente requiere la adición del líquido estéril portador, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Las disoluciones y suspensiones para inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.
- 10 Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes conservantes, agentes solubilizantes, agentes estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, desodorantes, sales (las propias sustancias de la presente invención pueden proporcionarse en forma de una sal farmacéuticamente aceptable), tampones, agentes de recubrimiento o antioxidantes. También pueden contener agentes terapéuticamente activos además de la sustancia de la presente invención.
- 15 Las dosis de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar entre límites amplios dependiendo de la enfermedad o la alteración que se va a tratar, la edad y el estado del individuo que se va a tratar, etc. y el médico determinará finalmente las dosis apropiadas que se van a usar.
- 15 Dichas composiciones pueden formularse para la medicina humana o veterinaria. La presente solicitud debería interpretarse como que se aplica igualmente a seres humanos y a animales, salvo que el contexto lo implique claramente de otro modo.
- 20 La presente desvelación también proporciona un anticuerpo contra una lactona o una molécula de señalización derivada de lactona secretada por bacterias gramnegativas para su uso en la provocación de autólisis de bacterias gramnegativas.
- 25 La presente desvelación también proporciona el uso de un anticuerpo contra una lactona o una molécula de señalización derivada de lactona secretada por bacterias gramnegativas en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección por gramnegativas en un sujeto, en el que el anticuerpo provoca la autólisis de las bacterias gramnegativas que infectan a dicho sujeto. El tratamiento puede ser profiláctico o con respecto a una dolencia existente.
- El anticuerpo se suministrará habitualmente como parte de una composición farmacéutica estéril que incluirá normalmente un portador farmacéuticamente aceptable, según se describió anteriormente. Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del procedimiento de administración deseado para el paciente), según se describió anteriormente.
- 30 Puede proporcionarse en una forma de dosificación unitaria, se proporcionará generalmente en un recipiente precintado y puede proporcionarse como parte de un kit. Dicho kit de partes incluirá normalmente (aunque no necesariamente) instrucciones de uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas de dosificación unitaria.
- 35 Los procedimientos de la presente desvelación pueden aplicarse a corto o a largo plazo, en enfermedades/dolencias agudas o crónicas causadas por el patógeno *Pseudomonas aeruginosa*, y es de particular interés con pacientes que padecen fibrosis quística. Adicionalmente, como los procedimientos de la invención están dirigidos particularmente a moléculas de señalización celular bacterianas, y no principalmente a las propias células bacterianas, no existirá una presión selectiva ejercida sobre las poblaciones bacterianas para que desarrollen resistencia a los tratamientos descritos.
- 40 El anticuerpo puede administrarse a pacientes infectados con objeto de modular y reducir la infección bacteriana mediante la destrucción de bacterias, y para reducir la patogenicidad de las supervivientes. Esto puede incluir la inhalación del anticuerpo en un aerosol por pacientes con fibrosis quística para aumentar la esperanza de vida.
- Los conjugados de las moléculas de señalización celular con proteínas inmunógenas pueden administrarse a individuos o pacientes con objeto de estimular una respuesta inmunitaria frente a la molécula de señalización de lactona, que da como resultado la generación de anticuerpos neutralizantes.
- 45 Pueden aplicarse procedimientos alternativos a la eliminación de las moléculas de señalización célula a célula bacterianas de la sangre de un paciente con objeto de modular la patogenicidad y la virulencia de los microorganismos infecciosos, y reducir las cargas bacterianas mediante la inducción de la muerte celular programada. Esto puede conseguirse con otros receptores o moléculas naturales basados en moléculas naturales que se unen a dichas moléculas de señalización de lactona. Alternativamente pueden aplicarse receptores no naturales tales como polímeros sellados molecularmente (*molecularly imprinted polymers*, MIPs). Esta clase de receptores ha demostrado ser capaz de unirse específicamente a pequeñas biomoléculas de bajo peso molecular tales como fármacos (Hart y col., 2000) y esteroides (Whitcombe y col., 1995; Ramstrom y col., 1996; Rachkov y col., 2000).
- 50 El receptor puede tener actividad catalítica o enzimática, y ser capaz de convertir la molécula de señalización celular de lactona en una forma que ya no sea reconocida por el organismo objetivo, que percibe entonces un exceso de molécula de señalización PQS con respecto a las moléculas de señalización de AHL (lactona).
- 55

El anticuerpo puede usarse en una o más de las aplicaciones anteriores en combinación, o en combinación con otras terapias, por ejemplo, antibióticos, para proporcionar regímenes terapéuticos aditivos y mejorados y un control del tratamiento.

5 Los anticuerpos (o equivalentes) de la presente desvelación podrían administrarse para tratar una infección bacteriana, o usarse como una medida preventiva para aquellos con un alto riesgo de infección. En el caso en el que ya exista una infección, los anticuerpos pueden administrarse solos o en combinación con anticuerpos u antibióticos antibacterianos u otros tratamientos antimicrobianos. La administración de anticuerpos anti-AHL junto con otras terapias puede permitir el uso de ciclos más cortos o dosis menores de terapéuticos, disminuyendo así el riesgo de aparición de resistencias y mejorando el cumplimiento del paciente.

10 Las características preferidas del segundo y los subsiguientes aspectos de la invención son como para el primer aspecto, con los cambios necesarios.

15 En una forma de realización preferida se proporciona un procedimiento para provocar la autólisis en una población de bacterias de *Pseudomonas aeruginosa*, comprendiendo dicho procedimiento la administración a la población de un anticuerpo contra una lactona o una molécula de señalización derivada de lactona secretada por las bacterias de *Pseudomonas aeruginosa* de forma que se provoque un desequilibrio en la proporción entre la molécula de señalización de acil-homoserina lactona (AHL) y la molécula de señalización de señal de quinolona de *Pseudomonas* (PQS) en el entorno de la población de las bacterias de *Pseudomonas aeruginosa*.

20 La presente desvelación también proporciona un procedimiento para el tratamiento de una infección por bacterias de *Pseudomonas aeruginosa* en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la administración al sujeto de un anticuerpo contra una lactona o una molécula de señalización derivada de lactona secretada por las bacterias de *Pseudomonas aeruginosa* de forma que se provoque un desequilibrio en la proporción entre la molécula de señalización de acil homoserina lactona (AHL) y la molécula de señalización de señal de quinolona de *Pseudomonas* (PQS) en el entorno de la población de las bacterias de *Pseudomonas aeruginosa*.

25 En dichas formas de realización, la molécula de señalización de acil-homoserina lactona (AHL) puede ser OdDHL y/o BHL. Los anticuerpos pueden ser scAbs G3H5, G3B12, G3G2 y/o G3H3 (G3B12 se denomina en lo sucesivo en este documento Hap 2 y el anticuerpo G3G2 se denomina en lo sucesivo en este documento Hap 5).

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención, incluyendo, pero no limitándose a, aplicaciones relacionadas en hospedadoras vegetales y animales, serán aparentes para los expertos en la materia tras la revisión de la memoria descriptiva y las reivindicaciones de la invención.

30 Para los expertos habituales en la materia será aparente que las composiciones y procedimientos desvelados en este documento pueden tener aplicación a través de un amplio intervalo de organismos para inhibir, modular, tratar o diagnosticar enfermedades o dolencias resultantes de una infección. Las composiciones y procedimientos de la presente invención se describen con referencia a *Pseudomonas aeruginosa*, pero está en la competencia del experto habitual en la materia aplicar los objetos de este documento a otras especies.

35 La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia al ejemplo y las figuras detalladas a continuación.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un ELISA de competición de la unión de los anticuerpos anti-AHL de cadena única Hap2 y Hap 5 a dDHL-BSA en presencia de dDHL libre y BHL respectivamente.

40 La Figura 2 muestra la drástica reducción de *Ps. aeruginosa* viables transferidas a animales PA01 en presencia del anticuerpo de cadena única Hap2 en hielo durante 40 minutos. La reducción es del orden de 1,5 log UFC/ml.

La Figura 3 muestra que la supervivencia de la cepa de *Ps. aeruginosa* PA14 no transferida a animales en presencia de anticuerpos monoclonales de cadena única Hap2 o Hap5 en comparación con un control de PBS.

45 La Figura 4 muestra las cargas bacterianas de *P. aeruginosa* viable en el torrente sanguíneo de muestras sanguíneas de cola tomadas a las 24 h tras la infección durante estudios de supervivencia. La viabilidad a las 24 h tras la infección está significativamente reducida por el tratamiento de ratones con anticuerpo Hap2, mezcla de anticuerpos Hap2 y Hap5 o gentamicina. N = 6 por grupo. *P<0,01 y +P<0,05 menor para el grupo indicado que para el grupo de control negativo de PBS. La línea de puntos representa el límite de detección del ensayo de recuento viable en sangre.

50 La Figura 5 muestra los tiempos de supervivencia de ratones en el modelo de infección pulmonar. N = 6 por grupo. *P<0,01 y +P<0,05 más largo para el grupo indicado que para el control negativo de PBS.

La Figura 6 muestra las cargas bacterianas de muestras sanguíneas de cola tomadas a las 24 h tras la infección a partir de estudios de supervivencia y estudios bacteriológicos combinados. N = 12 por grupo, *

$P < 0,01$ y $+P < 0,05$ menor para el grupo indicado que para el grupo de control negativo de PBS. La línea de puntos representa el límite de detección del ensayo de recuento viable en sangre.

5 La Figura 7 muestra las cargas bacterianas en las vías respiratorias pulmonares (fluido BAL) a las 12 h tras la infección. $N = 6$ por grupo. * $P < 0,01$ y $+P < 0,05$ menor para el grupo indicado que para el grupo de control negativo de PBS. La línea de puntos representa el límite de detección del ensayo de recuento viable en las vías respiratorias pulmonares.

La Figura 8 muestra las cargas bacterianas en tejido pulmonar a las 24 h tras la infección. $N = 6$ por grupo, * $P < 0,01$ menor para el grupo indicado que para el grupo de control negativo de PBS. La línea de puntos representa el límite de detección del ensayo de recuento viable en tejido pulmonar.

10 **Ejemplo 1: generación de anticuerpos anti-AHL.**

Se cribó una genoteca de expresión de fagos de anticuerpos humanos intactos frente a conjugados de la acil-homoserina lactona dDHL (dodecanoil homoserina lactona). En resumen, se conjugó un derivado de la dDHL que incluía un grupo carboxilo en el extremo de una cadena de acilo con las proteínas portadoras albúmina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*, BSA) y tiroglobulina bovina (*Bovine Thyroglobulin*, TG), usando una química bien conocida. 15 La genoteca de anticuerpos se cribó frente a cada conjugado alternativamente durante tres rondas, aislando y amplificado aquellos fagos que se unían al conjugado, y usándolos para la subsiguiente ronda. Después de la primera ronda, todos los fagos unidos se recuperaban y amplificaban. Durante la segunda y tercera rondas, los fagos unidos se eluyeron a partir del conjugado inmovilizado mediante incubación con una disolución de dDHL o BHL (butil-homoserina lactona) natural soluble libre. Los anticuerpos de fagos monoclonales de la tercera ronda se cribaron inicialmente según su unión a los conjugados de AHL, y a la proteína portadora sola. Estos clones que se unían únicamente al antígeno conjugado se cribaron adicionalmente según su capacidad de unirse a o dDHL libre o BHL libre, mediante un ELISA de competición. Se aislaron dos clones, denominados Hap 2 y Hap 5, que podrían ser 20 inhibidos en la unión al dDHL-conjugado en presencia de dDHL libre (Hap 2) y BHL libre (Hap 5) (Figura 1).

Ejemplo 2: ensayo de viabilidad de *Pseudomonas aeruginosa*

25 Se transfirió la cepa clínica de *Ps. aeruginosa* PA01 a ratones hembra BALB/c (Charles River, de aproximadamente 30 días de edad) mediante la inyección intraperitoneal de 50 microlitros de caldo de cultivo de un día PA01 que contenía aproximadamente 5×10^8 UFC según se determinó mediante diluciones sucesivas en placas. Después de 24 horas se recogió una muestra de sangre del plexo retroorbital y se recuperó la cepa PA01 del cultivo sanguíneo. Las cepas fueron confirmadas como *Ps. aeruginosa* mediante una tinción de Gram, la morfología de las colonias y la producción de piocianina. Las alícuotas de las bacterias se almacenaron a -70°C y cuando se requirieron, se descongelaron rápidamente, se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en 50 microlitros de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril o PBS estéril que contenía anticuerpo Hap2 a una 30 concentración de $37,5 \mu\text{M}$. Las alícuotas de las bacterias se colocaron en hielo y se colocaron en placas en diluciones sucesivas en PBS en placas con base de agar-sangre en diversos puntos temporales (0, 20, 40 minutos). Las placas se incubaron hasta el día siguiente a 37°C y las colonias se contaron para determinar las cifras bacterianas viables en cada punto temporal (Figura 2).

Se desarrolló un segundo ensayo usando la cepa clínica de *P. aeruginosa* PA14 que no había sido previamente transferida a ratones. Se hizo crecer un cultivo de 5 ml de PA14 hasta el día siguiente a 37°C en LB. Se realizaron diluciones sucesivas de 10 veces hasta 10^6 en caldo L, y se añadieron 50 μL de dilución a 50 μL de PBS, anticuerpo 40 Hap2 ($37,5 \mu\text{M}$) o anticuerpo Hap5 ($15 \mu\text{M}$). Las muestras se incubaron en hielo durante diversos periodos de tiempo y después se colocaron inmediatamente en placas de agar de infusión de cerebro y corazón y se incubaron hasta el día siguiente a 37°C . Entonces se contaron las cifras de colonias para cada placa (Figura 3).

Ejemplo 3: modelo de infección pulmonar de *Pseudomonas aeruginosa*.

Se transfirió la cepa clínica de *Ps. aeruginosa* PA01 a ratones hembra BALB/c (Charles River, de aproximadamente 45 4 semanas de edad) mediante la inyección intraperitoneal de 50 microlitros de caldo de cultivo de un día PA01 que contenía aproximadamente 5×10^8 UFC según se determinó mediante diluciones sucesivas en placas. Después de 24 horas se recogió una muestra de sangre del plexo retroorbital y se recuperó la cepa PA01 del cultivo sanguíneo. Las cepas fueron confirmadas como *Ps. aeruginosa* mediante una tinción de Gram, la morfología de las colonias y la producción de piocianina. Las alícuotas de las bacterias se almacenaron a -70°C y cuando se requirieron, se descongelaron rápidamente, se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril. Las diluciones sucesivas de las bacterias en PBS se colocaron en placas en 50 unas placas con base de agar-sangre para el recuento de las células viables. Las placas se incubaron hasta el día siguiente a 37°C y se contaron las colonias para determinar las cifras bacterianas viables.

Para el primer experimento de infección pulmonar, se controló la supervivencia y la bacteriemia durante un periodo de una semana. Se anestesiaron levemente seis hembras adultas de ratones BALB/c (aprox. 4 semanas de edad) por grupo de tratamiento usando halotano al 2,5 % (v/v). Se administró una dosis infecciosa de $1,0 \times 10^7$ UFC de PA01 resuspendida en PBS estéril o PBS que contenía anticuerpos en las fosas nasales en un volumen total de 50 μL . La dosis infecciosa se confirmó colocando en placas diluciones seriadas en placas con base de agar-sangre para

- el recuento de células viables. Se controlaron los cinco grupos de tratamiento; el primer grupo se infectó con PA01 suspendido en PBS solo; el segundo grupo se infectó con PA01 mezclado con Hap 2 37,5 µM en PBS; el tercero se infectó con PA01 mezclado con Hap 5 15 µM en PBS; el cuarto se infectó con PA01 mezclado con los anticuerpos anti-AHL Hap 2 y Hap 5; y el grupo final se infectó con PA01 mezclado con PBS y se le dio un ciclo de inyecciones subcutáneas de 0,2 mg de gentamicina (primera inyección 2 h después de la infección, después con subsiguientes recuerdos s/c dos veces al día durante 3 días). Para los grupos 2 y 3, se mezclaron anticuerpos Hap 2 37,5 µM o anticuerpos Hap 5 15 µM con la dosis infecciosa inmediatamente antes de la infección intranasal (por ejemplo, 10 µl de bacterias más 40 µl de anticuerpo). Para el grupo 4, se mezclaron 10 µl de bacterias con 20 µl de Hap 2 37,5 µM y 20 µl de de Hap 5 15 µM.
- 5 A las 2 h tras la infección se les administró a los ratones un recuerdo intravenoso de PBS o PBS que contenía anticuerpos inyectando directamente un volumen total de 50 µl en una vena de la cola.
- 10 A las 24 h se extrajo un pequeño volumen de sangre de la vena de la cola de cada ratón usando una jeringa de 1 ml (12,7 mm) para la determinación de la bacteriemia usando un recuento de células viables en placas BAB (Figura 4). El tratamiento con Hap2, Hap 2 mezclado con Hap5 o con gentamicina redujo significativamente los niveles de *P. aeruginosa* viable en el torrente sanguíneo a las 24 h.
- 15 Con objeto de determinar los criterios de valoración experimentales, se controlaron frecuentemente los síntomas (pesos, estado, comportamiento) durante las 168 h tras la infección, y los ratones fueron seleccionados antes de alcanzar, o al alcanzar un estado moribundo. Los tiempos tras la infección en los que se seleccionó cada animal se registraron y se usaron como una medida de la "supervivencia". A los animales que sobrevivieron los 7 días del proceso infeccioso se les asignó un tiempo de supervivencia arbitrario de 168 h para el análisis estadístico (Figura 5, Tabla 1). Todos los ratones infectados perdieron peso durante los 3 primeros días tras la infección, pero los animales que sobrevivieron a la exposición bacteriana se recuperaron después y su peso volvió a su línea basal 1 semana después de la infección. Esta tendencia no se vio afectada por el tratamiento con ninguno de los anticuerpos ni con la gentamicina. Los tiempos de supervivencia de los ratones aumentaron significativamente por el tratamiento de los ratones con Hap 5, Hap 2/Hap5 o gentamicina. Un ratón de los grupos de tratamiento Hap 2 y Hap2/5 sobrevivió a la infección.
- 20
- 25

Tabla 1

Tratamiento	Tiempos de supervivencia (h)					
PBS	24	27,5	27,5	27,5	27,5	30
Hap 2	27,5	27,5	30	37	37	S
Hap 5	27,5	32,5	32,5	37	37	57+
Hap 2/5	24	32,5	37	37	37	S+
Gentamicina	S	S	S	S	S	S

Tabla 1. Muestra los tiempos de supervivencia de ratones en el modelo de infección N = 6 por grupo, *P<0,01 y +P<0,05 más largo para el grupo indicado que para el control negativo de PBS, S= sobrevivió a la infección.

Ejemplo 4: efecto del anticuerpo sobre la carga bacteriana

- 30 Se infectaron cinco grupos de tratamiento de 6 ratones según se describió anteriormente, y se les dio un régimen idéntico de PBS, PBS más anticuerpos o gentamicina. Se seleccionaron dos puntos temporales (12 h y 24 h) para el análisis bacteriológico en sangre (Figura 6), en el fluido de lavado broncoalveolar (*bronchoalveolar lavage*, BAL) (Figura 7), y en el tejido pulmonar (Figura 8). Los datos del análisis de sangre se combinaron con los del experimento de supervivencia (Ejemplo 2) con objeto de incrementar la validez estadística. En este caso, la viabilidad de *P. aeruginosa* en el torrente sanguíneo se redujo significativamente mediante el tratamiento con Hap 2, Hap 5 o gentamicina.
- 35 Se determinaron las cargas bacterianas en el fluido BAL y en sangre mediante el recuento de células viables usando diluciones sucesivas en placas BAB, como antes. La viabilidad de *P. aeruginosa* en las vías aéreas pulmonares (fluido BAL) 12 h tras la infección está significativamente reducida mediante el tratamiento de los ratones con Hap 2, Hap 5 o gentamicina.
- 40 La carga bacteriana en el tejido pulmonar se determinó extrayendo, pensando y homogeneizando los pulmones en 5 ml de PBS estéril usando un homogeneizador tisular eléctrico, después colocando en placas BAB las diluciones sucesivas para realizar el recuento de células viables. Se observaron tendencias similares en la reducción de la carga bacteriana en el tejido pulmonar examinado 24 h tras la infección (Figura 8), aunque sólo los grupos de Hap5 y gentamicina consiguieron reducciones estadísticamente significativas en las cargas bacterianas.
- 45 Se calcularon las medias geométricas de todos los resultados, y se muestran junto con ± 1 error estándar de la media (*standard error of the mean*, SEM). Los ensayos de supervivencia se analizaron usando las pruebas U de Mann-Whitney; todos los demás datos se analizaron con la prueba de la t de Student, y se consideró un valor de P

de <0,05, como estadísticamente significativo.

Referencias citadas

Documentos patentes de EE.UU.

6.309.651 octubre de 2001 Frank y col.

Otros documentos patentes

Documento WO 01/26650 April 2001 Universidad de Nottingham

Documento WO 01/74801 October 2001 Universidad de Nottingham

Documento WO 92/01047 October 2001 Bonnert y col.


Otras referencias

- 10 Williams y col., 1996 Microbiol-UK 142: 881-888
 Stintzi y col., 1998 FEMS Microbiol Lett. 166 (2): 341-345
 Glessner y col., 1999 J. Bacteriol. 181 (5): 1623-1629
 Brint and, Ohman 1995 J. Bacteriol. 177 (24): 7155-7163
 Reimmann y col., 1997 Mol. Microbiol. 24 (2): 309-319
 15 Winzer y col., 2000 J. Bacteriol. 182 (22): 6401-6411
 Gambello and Iglewski 1991 J. Bacteriol. 173 (9): 3000-3009
 Latifi y col., 1995 Mol. Microbiol 17 (2): 333-343
 Passador y col., 1993 Science 260: 1127-1130
 Pearson y col., 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91 (1): 197-201
 20 Winson y col., 1995 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92 (20): 9427-9431
 Pesci y col., 1997 J. Bacteriol. 179 (10): 3127-3132
 Toder y col., 1991 Mol. Microbiol. 5 (8): 2003-2010
 Gambello y col., 1993 Infect. Immun. 61 (4): 1180-1184
 Ochsner y col., 1994 J. Bacteriol. 176, 2044-2054
 25 Pearson y col., 1995 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92 (5) 1490-1494
 Latifi y col., 1996 Mol. Microbiol 21 (6): 1137-1146
 Winzer y col., 2000 J. Bacteriol. 182 (22): 6401-6411
 Pesci y col, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 96: 11229-11234
 Déziel y col., 2004 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 101 (5): 1339-1344
 30 Diggle y col., 2003 Molecular Microbiology 50 (1): 29-43
 McGrath y col. 2004 FEMS Microbiol. Letters 230: 27-34
 McKnight y col., 2000 J. Bacteriol. 182: 2702-2708
 Bums y col., 2001 J. Infect. Dis. 183: 444-452
 Singh y col., 2000 Nature 407: 762-764
 35 Wu y col., 2000 Microbiology 146: 2481-2493
 Wu y col., 2004 Microbes and Infection 6: 34-37
 D'Argenio y col., 2002 Journal of Bacteriology 184 (23): 6481-6489
 Guina y col., 2003 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 100 (5): 2771-2776
 Manefield y col., 1999 Microbiol. UK 145: 283-291
 40 Tepletski y col., 2000 Mol. Plant Microbe. Interact., 13, 637-648
 Kohler and Milstein, 1975 Nature 256: 495-497
 Roitt y col, Immunology segunda edición (1989), Churchill Livingstone, Londres.
 Dougall y col., 1994 TibTech 12: 372-379
 McCafferty y col., 1990 Nature 348: 552-554
 45 Huston y col., 1993 Int. Rev. Immunol., 10: 195-217

Nº de referencia del expediente del solicitante o del mandatario	Solicitud internacional Nº P38578WO/NCB
--	---

INDICACIONES RELATIVAS AL DEPÓSITO DE UN MICROORGANISMO

(Regla 13bis del PCT)

A. Los datos indicados más abajo se refieren al depósito de un microorganismo o material biológico mencionado en la descripción página _____17_____, línea _____21_____	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO Se identifican otros depósitos en una hoja adicional (x)	
Nombre de la institución de depósito NCIMB Ltd	
Dirección de la institución de depósito (<i>incluidos código postal y país</i>) 23 St Machar Drive Aberdeen AB24 3RY Escocia	
Fecha de depósito: 18 de marzo de 2003	nº de acceso NCIMB 41167
C. INDICACIONES ADICIONALES (<i>sólo en caso necesario</i>) Esta información continua en una hoja adicional	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (<i>sólo si las indicaciones no se facilitan para todos los Estados designados</i>)	
Con respecto a todos los estados designados en los que dicha acción es posible y hasta el grado en que es legalmente permisible según las leyes del estado designado, se requiere que la muestra del material biológico depositado esté disponible únicamente mediante la expedición de la misma por un experto independiente, según la legislación sobre patentes pertinente, por ejemplo, normativa EPC 28 (4), Normativas sobre Patentes del Reino Unido de 1995, anexo 2, párrafo 3, Normativa Reguladora australiana 3.25 (3), y generalmente provisiones similares mutatis mutandis para cualquier otro estado designado.	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (<i>sólo en caso necesario</i>)	
Las indicaciones enumeradas a continuación se suministrarán con posterioridad a la Oficina Internacional (<i>especificar la naturaleza general de las indicaciones, por ejemplo "nº de acceso del depósito"</i>)	
Reservado a la Oficina receptora	Reservado a la Oficina Internacional
(x) Esta hoja se recibió junto con la solicitud internacional	Esta hoja se ha recibido en la Oficina Internacional el:
Funcionario autorizado 	Funcionario autorizado

Formulario PCT/RO/134 (julio 1992)

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS
PARA FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES**

Haptogen Ltd
Polworth Building
Foresterhill
Aberdeen
AB25 2ZD

FORMULARIO INTERNACIONAL

CERTIFICADO DE RECEPCIÓN EN CASO DE PRIMER DEPÓSITO emitido conforme a la Regla 7.1 por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada al final de esta página

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE


I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación asignada por el DEPOSITANTE <i>Escherichi coli</i> XL1 - Blue G3H5	Número de acceso asignado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE NCIMB 41167
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
Con el microorganismo designado en I. se presenta () una descripción científica (x) una designación taxonómica propuesta (marcar con una cruz lo que corresponda)	
III. ENTRADA Y RECEPCIÓN	
Esta Autoridad Internacional de Depósito acepta el microorganismo designado en I., el cual fue entregado aquí el 18 de marzo de 2003 (fecha del primer depósito) ¹ .	
IV. ENTRADA DE LA SOLICITUD DE TRANSFORMACIÓN	
El microorganismo identificado en I. ha entrado en esta Autoridad Internacional de Depósito el _____ (fecha del depósito) y se recibió una solicitud de transformación de este depósito en un depósito según el Tratado de Budapest el _____ (fecha de entrada de la primera solicitud de transformación).	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: NCIMB Ltd representantes del (los)	Firma(s) de la(s) persona(s) reconocidas como de la autoridad internacional de depósito o empleado(s) autorizado(s): 
Dirección: 23 St Machar Drive Aberdeen AB24 3RY Escocia	Fecha: 27 de marzo de 2003

¹ En el caso de corresponder la Regla 6.4 (d), dicha fecha es la fecha en la cual se ha adquirido el estado de Autoridad Internacional De Depósito.

Nº de referencia del expediente del solicitante o del mandatario	Solicitud internacional Nº P38578WO/NCB
--	---

INDICACIONES RELATIVAS AL DEPÓSITO DE UN MICROORGANISMO

(Regla 13bis del PCT)

A. Los datos indicados más abajo se refieren al depósito de un microorganismo o material biológico mencionado en la descripción página _____ 17 _____, línea _____ 21 y 22 _____	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO Se identifican otros depósitos en una hoja adicional (x)	
Nombre de la institución de depósito NCIMB Ltd	
Dirección de la institución de depósito (<i>incluidos código postal y país</i>) 23 St Machar Drive Aberdeen AB24 3RY Escocia	
Fecha de depósito: 18 de marzo de 2003	nº de acceso NCIMB 41168
C. INDICACIONES ADICIONALES (<i>sólo en caso necesario</i>) Esta información continua en una hoja adicional	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (<i>sólo si las indicaciones no se facilitan para todos los Estados designados</i>)	
Con respecto a todos los estados designados en los que dicha acción es posible y hasta el grado en que es legalmente permisible según las leyes del estado designado, se requiere que la muestra del material biológico depositado esté disponible únicamente mediante la expedición de la misma por un experto independiente, según la legislación sobre patentes pertinente, por ejemplo, normativa EPC 28 (4), Normativas sobre Patentes del Reino Unido de 1995, anexo 2, párrafo 3, Normativa Reguladora australiana 3.25 (3), y generalmente provisiones similares mutatis mutandis para cualquier otro estado designado.	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (<i>sólo en caso necesario</i>)	
Las indicaciones enumeradas a continuación se suministrarán con posterioridad a la Oficina Internacional (<i>especificar la naturaleza general de las indicaciones, por ejemplo "nº de acceso del depósito"</i>)	
Reservado a la Oficina receptora	Reservado a la Oficina Internacional
(x) Esta hoja se recibió junto con la solicitud internacional	Esta hoja se ha recibido en la Oficina Internacional el:
Funcionario autorizado 	Funcionario autorizado

Formulario PCT/RO/134 (julio 1992)

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS
PARA FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES**

Haptogen Ltd
Polworth Building
Foresterhill
Aberdeen
AB25 2ZD

FORMULARIO INTERNACIONAL

CERTIFICADO DE RECEPCIÓN EN CASO DE PRIMER DEPÓSITO emitido conforme a la Regla 7.1 por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada al final de esta página

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE


I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación asignada por el DEPOSITANTE DEPÓSITO <i>Escherichi coli</i> G3B12	Número de acceso asignado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE NCIMB 41168
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
Con el microorganismo designado en I. se presenta () una descripción científica (x) una designación taxonómica propuesta (marcar con una cruz lo que corresponda)	
III. ENTRADA Y RECEPCIÓN	
Esta Autoridad Internacional de Depósito acepta el microorganismo designado en I., el cual fue entregado aquí el 18 de marzo de 2003 (fecha del primer depósito) ¹ .	
IV. ENTRADA DE LA SOLICITUD DE TRANSFORMACIÓN	
El microorganismo identificado en I. ha entrado en esta Autoridad Internacional de Depósito el _____ (fecha del depósito) y se recibió una solicitud de transformación de este depósito en un depósito según el Tratado de Budapest el _____ (fecha de entrada de la primera solicitud de transformación).	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: NCIMB Ltd representantes del (los) Dirección: 23 St Machar Drive Aberdeen AB24 3RY Escocia	Firma(s) de la(s) persona(s) reconocidas como de la autoridad internacional de depósito o empleado(s) autorizado(s):  Fecha: 27 de marzo de 2003

¹ En el caso de corresponder la Regla 6.4 (d), dicha fecha es la fecha en la cual se ha adquirido el estado de Autoridad Internacional de Depósito.

Nº de referencia del expediente del solicitante o del mandatario	Solicitud internacional Nº P38578WO/NCB
--	---

INDICACIONES RELATIVAS AL DEPÓSITO DE UN MICROORGANISMO

(Regla 13bis del PCT)

A. Los datos indicados más abajo se refieren al depósito de un microorganismo o material biológico mencionado en la descripción página _____ 17 _____, línea _____ 22	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO Se identifican otros depósitos en una hoja adicional (x)	
Nombre de la institución de depósito NCIMB Ltd	
Dirección de la institución de depósito (<i>incluidos código postal y país</i>) 23 St Machar Drive Aberdeen AB24 3RY Escocia	
Fecha de depósito: 18 de marzo de 2003	nº de acceso NCIMB 41168
C. INDICACIONES ADICIONALES (<i>sólo en caso necesario</i>) Esta información continua en una hoja adicional	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (<i>sólo si las indicaciones no se facilitan para todos los Estados designados</i>)	
Con respecto a todos los estados designados en los que dicha acción es posible y hasta el grado en que es legalmente permisible según las leyes del estado designado, se requiere que la muestra del material biológico depositado esté disponible únicamente mediante la expedición de la misma por un experto independiente, según la legislación sobre patentes pertinente, por ejemplo, normativa EPC 28 (4), Normativas sobre Patentes del Reino Unido de 1995, anexo 2, párrafo 3, Normativa Reguladora australiana 3.25 (3), y generalmente provisiones similares mutatis mutandis para cualquier otro estado designado.	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (<i>sólo en caso necesario</i>)	
Las indicaciones enumeradas a continuación se suministrarán con posterioridad a la Oficina Internacional (<i>especificar la naturaleza general de las indicaciones, por ejemplo "nº de acceso del depósito"</i>)	
Reservado a la Oficina receptora	Reservado a la Oficina Internacional
(x) Esta hoja se recibió junto con la solicitud internacional	Esta hoja se ha recibido en la Oficina Internacional el:
Funcionario autorizado 	Funcionario autorizado

Formulario PCT/RO/134 (julio 1992)

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS
PARA FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES**

Haptogen Ltd
Polworth Building
Foresterhill
Aberdeen
AB25 2ZD

FORMULARIO INTERNACIONAL

CERTIFICADO DE RECEPCIÓN EN CASO DE PRIMER DEPÓSITO emitido conforme a la Regla 7.1 por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada al final de esta página

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE


I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación asignada por el DEPOSITANTE DEPÓSITO <i>Escherichi coli</i> G3G2	Número de acceso asignado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE NCIMB 41169
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
Con el microorganismo designado en I. se presenta () una descripción científica (x) una designación taxonómica propuesta (marcar con una cruz lo que corresponda)	
III. ENTRADA Y RECEPCIÓN	
Esta Autoridad Internacional de Depósito acepta el microorganismo designado en I., el cual fue entregado aquí el 18 de marzo de 2003 (fecha del primer depósito) ¹ .	
IV. ENTRADA DE LA SOLICITUD DE TRANSFORMACIÓN	
El microorganismo identificado en I. ha entrado en esta Autoridad Internacional de Depósito el _____ (fecha del depósito) y se recibió una solicitud de transformación de este depósito en un depósito según el Tratado de Budapest el _____ (fecha de entrada de la primera solicitud de transformación).	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: NCIMB Ltd representantes del (los) Dirección: 23 St Machar Drive Aberdeen AB24 3RY Escocia	Firma(s) de la(s) persona(s) reconocidas como de la autoridad internacional de depósito o empleado(s) autorizado(s):  Fecha: 27 de marzo de 2003

¹ En el caso de corresponder la Regla 6.4 (d), dicha fecha es la fecha en la cual se ha adquirido el estado de Autoridad Internacional de Depósito.

Nº de referencia del expediente del solicitante o del mandatario	Solicitud internacional Nº P38578WO/NCB
--	---

INDICACIONES RELATIVAS AL DEPÓSITO DE UN MICROORGANISMO

(Regla 13bis del PCT)

A. Los datos indicados más abajo se refieren al depósito de un microorganismo o material biológico mencionado en la descripción página _____ 17 _____, línea _____ 22	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO Se identifican otros depósitos en una hoja adicional	
Nombre de la institución de depósito NCIMB Ltd	
Dirección de la institución de depósito (<i>incluidos código postal y país</i>) 23 St Machar Drive Aberdeen AB24 3RY Escocia	
Fecha de depósito: 18 de marzo de 2003	nº de acceso NCIMB 41170
C. INDICACIONES ADICIONALES (<i>sólo en caso necesario</i>) Esta información continua en una hoja adicional	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (<i>sólo si las indicaciones no se facilitan para todos los Estados designados</i>)	
Con respecto a todos los estados designados en los que dicha acción es posible y hasta el grado en que es legalmente permisible según las leyes del estado designado, se requiere que la muestra del material biológico depositado esté disponible únicamente mediante la expedición de la misma por un experto independiente, según la legislación sobre patentes pertinente, por ejemplo, normativa EPC 28 (4), Normativas sobre Patentes del Reino Unido de 1995, anexo 2, párrafo 3, Normativa Reguladora australiana 3.25 (3), y generalmente provisiones similares mutatis mutandis para cualquier otro estado designado.	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (<i>sólo en caso necesario</i>)	
Las indicaciones enumeradas a continuación se suministrarán con posterioridad a la Oficina Internacional (<i>especificar la naturaleza general de las indicaciones, por ejemplo "nº de acceso del depósito"</i>)	
Reservado a la Oficina receptora	Reservado a la Oficina Internacional
(x) Esta hoja se recibió junto con la solicitud internacional	Esta hoja se ha recibido en la Oficina Internacional el:
Funcionario autorizado 	Funcionario autorizado

Formulario PCT/RO/134 (julio 1992)

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS
PARA FINES DE PROCEDIMIENTO DE PATENTES**

Haptogen Ltd
Polworth Building
Foresterhill
Aberdeen
AB25 2ZD

FORMULARIO INTERNACIONAL

CERTIFICADO DE RECEPCIÓN EN CASO DE PRIMER DEPÓSITO emitido conforme a la Regla 7.1 por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada al final de esta página

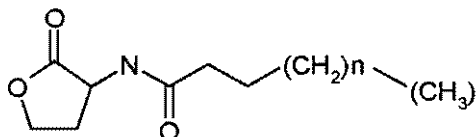
NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación asignada por el DEPOSITANTE DEPÓSITO <i>Escherichi coli</i> G3H3	Número de acceso asignado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE NCIMB 41170
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
Con el microorganismo designado en I. se presenta () una descripción científica (x) una designación taxonómica propuesta (marcar con una cruz lo que corresponda)	
III. ENTRADA Y RECEPCIÓN	
Esta Autoridad Internacional de Depósito acepta el microorganismo designado en I., el cual fue entregado aquí el 18 de marzo de 2003 (fecha del primer depósito) ¹ .	
IV. ENTRADA DE LA SOLICITUD DE TRANSFORMACIÓN	
El microorganismo identificado en I. ha entrado en esta Autoridad Internacional de Depósito el _____ (fecha del depósito) y se recibió una solicitud de transformación de este depósito en un depósito según el Tratado de Budapest el _____ (fecha de entrada de la primera solicitud de transformación).	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: NCIMB Ltd representantes del (los) Dirección: 23 St Machar Drive Aberdeen AB24 3RY Escocia	Firma(s) de la(s) persona(s) reconocidas como de la autoridad internacional de depósito o empleado(s) autorizado(s):  Fecha: 27 de marzo de 2003

¹ En el caso de corresponder la Regla 6.4 (d), dicha fecha es la fecha en la cual se ha adquirido el estado de Autoridad Internacional de Depósito.

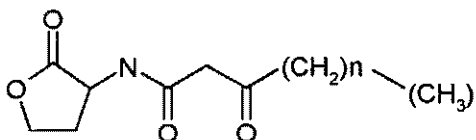
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para provocar la autólisis de una población de bacterias gramnegativas, comprendiendo dicho procedimiento la administración a la población de un anticuerpo contra una lactona o una molécula de señalización derivada de la lactona secretada por las bacterias gramnegativas, de forma que se provoque un desequilibrio en la proporción de la molécula de señalización de homoserina lactona (HL) y la molécula de señalización de señal de quinolona (QS) en el entorno de la población de las bacterias gramnegativas.
2. Un procedimiento según se reivindica en la reivindicación 1, en el que la molécula de señalización de homoserina lactona (HL) es una molécula de homoserina lactona con una fórmula elegida del grupo que consiste en:

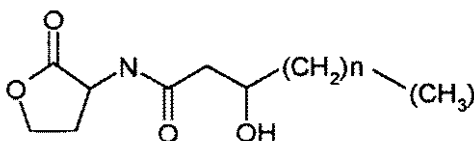


Fórmula (I)

10



Fórmula (II)

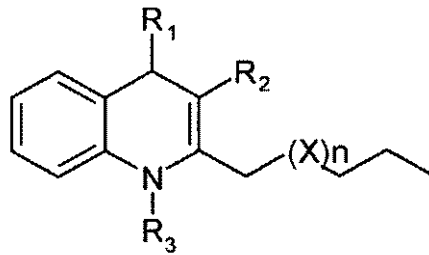


Fórmula (III)

15

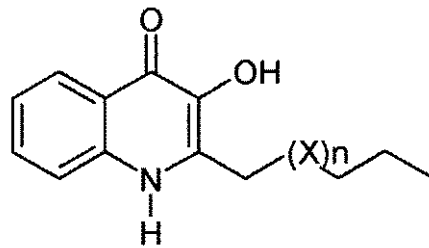
en las que $n =$ desde 0 hasta 12.

3. Un procedimiento según se reivindica en la reivindicación 2, en el que la molécula de homoserina lactona de fórmula general (I) es *N*-butanoil-L-homoserina lactona (BHL) en la que $n = 0$, *N*-dodecanoil-L-homoserina lactona (dDHL), en la que $n = 8$ y *n*-tetradecanoil-L-homoserina lactona (tDHL) en la que $n = 10$.
4. Un procedimiento según se reivindica en la reivindicación 2, en el que la molécula de homoserina lactona de fórmula general (II) es *N*-(-3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (OdDHL) en la que $n = 8$ o *N*-(-3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (OHHL) en la que $n = 2$.
5. Un procedimiento según se reivindica en la reivindicación 2 en el que la molécula de homoserina lactona de fórmula general (III) es *N*-(-3-hidroxibutanoil)-L-homoserina lactona (HBHL) en la que $n = 0$.
6. Un procedimiento según se reivindica en la reivindicación 2, en el que la molécula de señalización de lactona es OdDHL y/o BHL.
7. Un procedimiento según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la molécula de señalización de señal de quinolona (QS) es una molécula de fórmula general (IV):



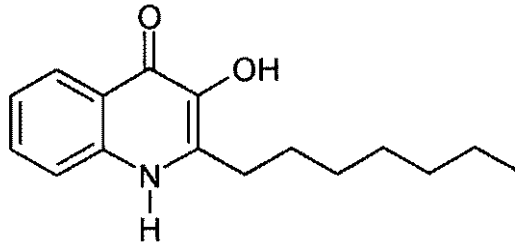
en la que n es desde 1 hasta 7, R₁ es =O, o -H,
R₂ es -OH, o -H, y
R₃ es -H, o alternativamente, el átomo de nitrógeno (N) no está sustituido.

- 5 8. Un procedimiento según se reivindica en la reivindicación 7, en el que la molécula de señal de quinolona de fórmula general (IV) es



2-acil-3-hidroxi-4-quinolona

- 10 9. Un procedimiento según se reivindica en la reivindicación 8, en el que la 2-acil-3-hidroxi-4-quinolona es 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona.



- 15 10. Un procedimiento según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la bacteria gramnegativa es *Pseudomonas aeruginosa* y la proporción de las moléculas de señalización es molécula de señalización de acil-homoserina lactona (AHL) de fórmula (I) y molécula de señalización de señal de quinolona (PQS) de *Pseudomonas*.

11. Un procedimiento según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que los anticuerpos son anticuerpos monoclonales o policlonales, o fragmentos de los mismos.

- 20 12. Un procedimiento según se reivindica en la reivindicación 11 en el que los fragmentos de anticuerpos son fragmentos de anticuerpos de cadena única (scAbs).

13. Un procedimiento según se reivindica en la reivindicación 12, en el que los anticuerpos de cadena única (scAbs) son G3H5, G3B12, G3G2 y/o G3H3 depositados como NCIMB-41167, NCIMB-41168, NCIMB-41169, NCIMB-41170, respectivamente.

Figura 1

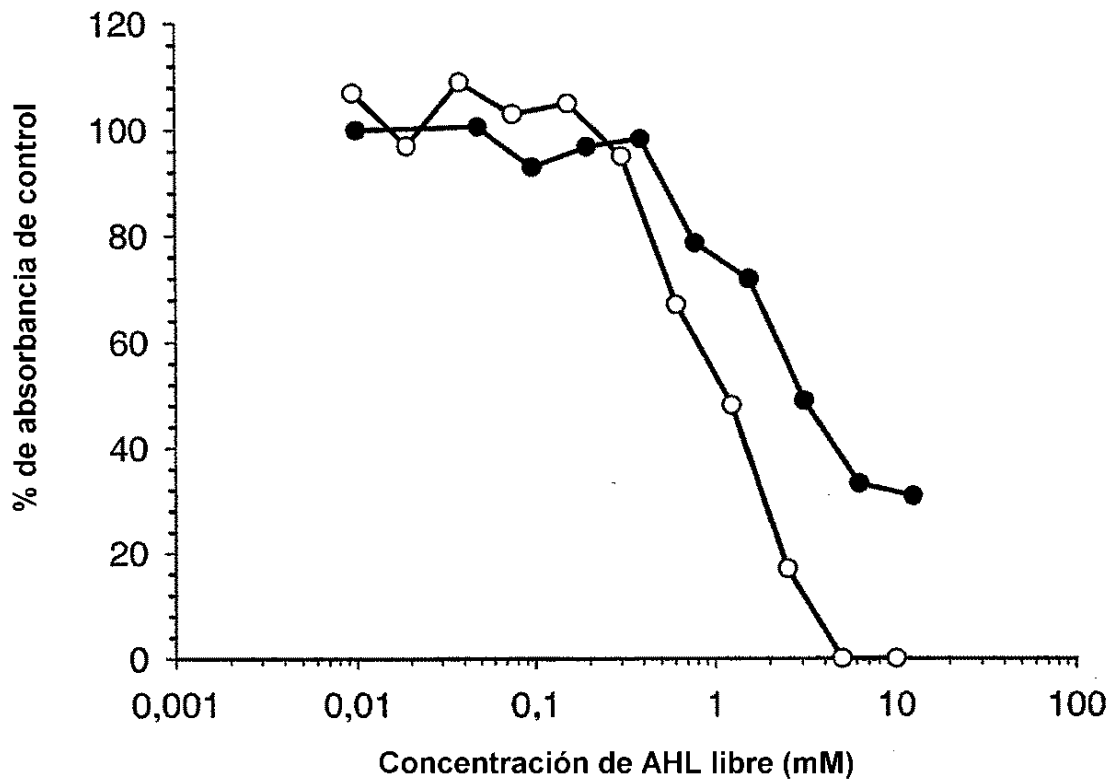


Figura 2

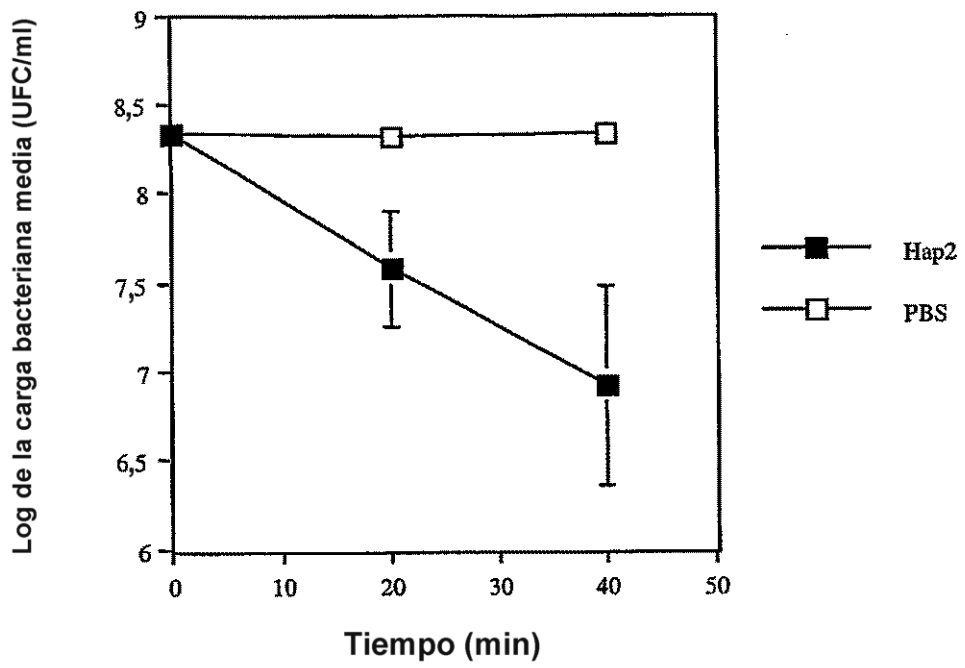


Figura 3

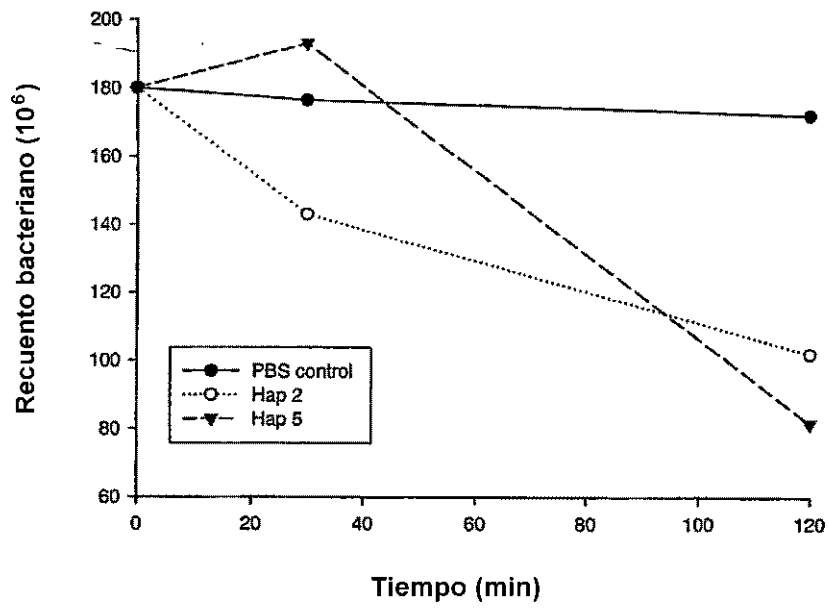


Figura 4

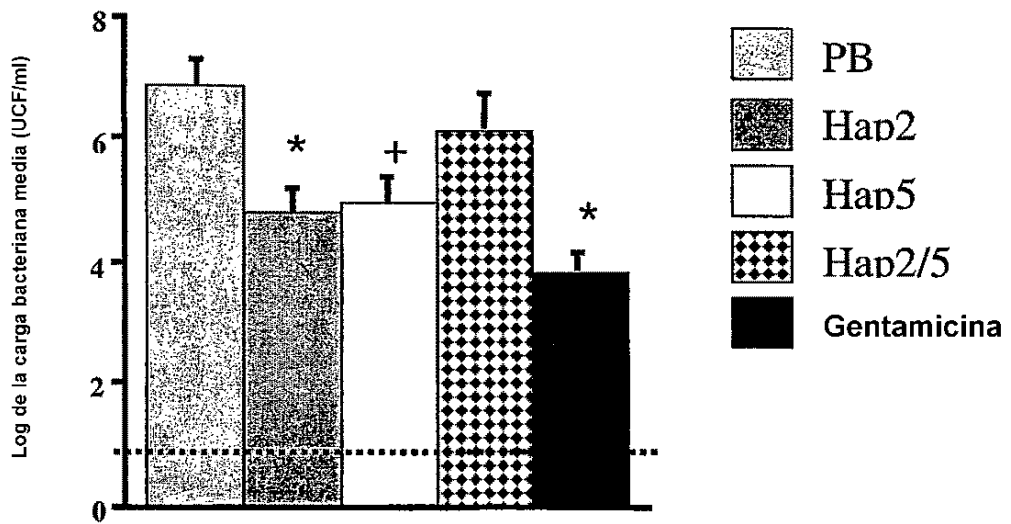


Figura 5

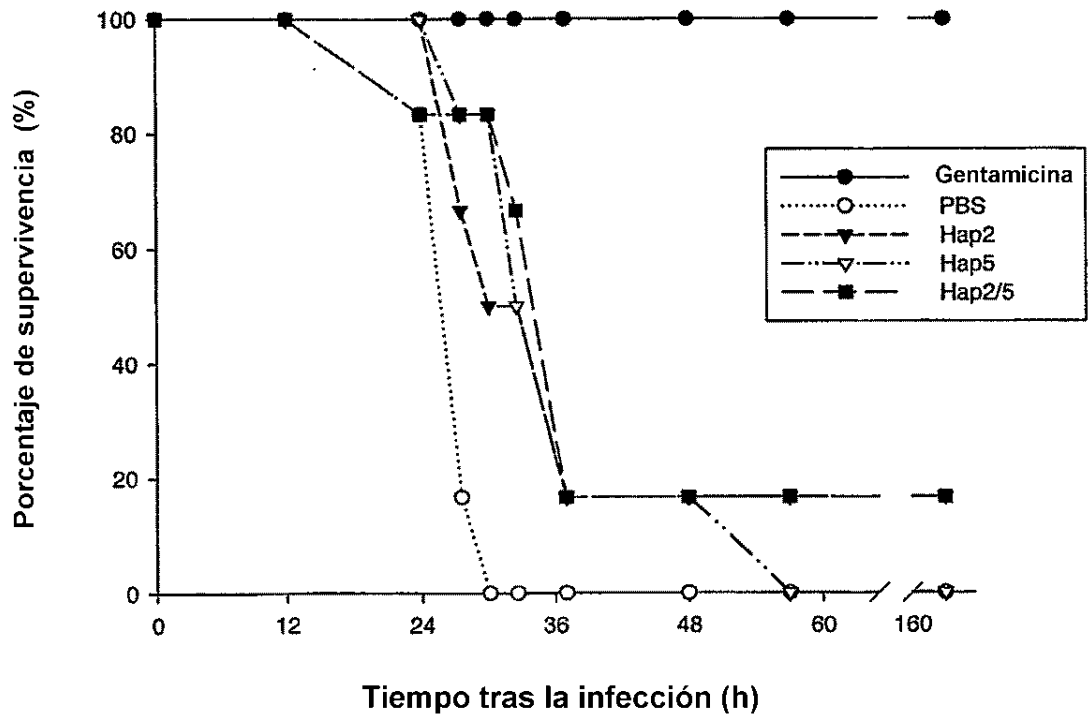


Figura 6

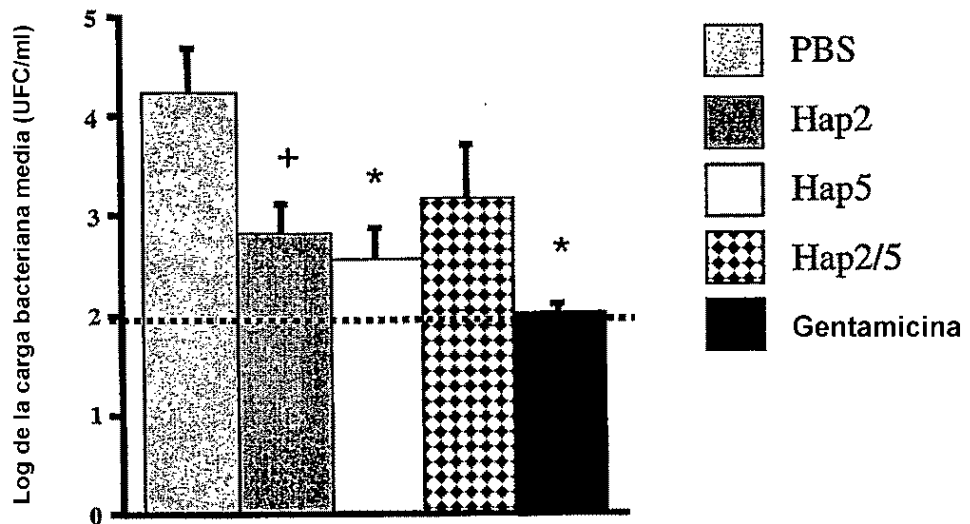


Figura 7

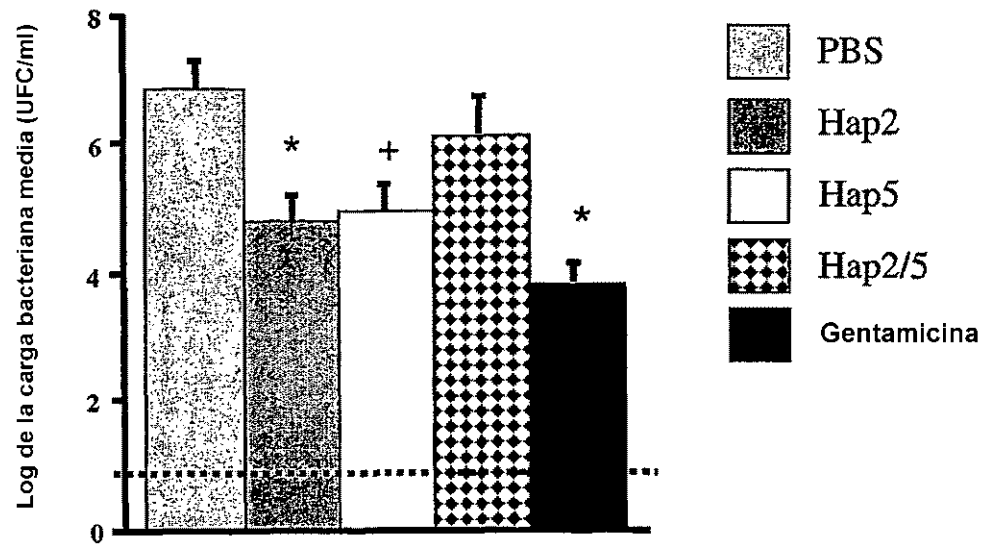


Figura 8

