

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 075**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 39/40** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**C07K 16/44** (2006.01)  
**C07K 16/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03784298 .6**  
96 Fecha de presentación: **13.08.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1528935**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.05.2005**

54 Título: **Procedimientos para el tratamiento de una enfermedad bacteriana infecciosa con un anticuerpo contra las moléculas señal derivadas de una antilactona o una lactona**

30 Prioridad:  
**13.08.2002 GB 0218951**  
**24.03.2003 GB 0306783**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.06.2012**

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

72 Inventor/es:  
**CHARLTON, Keith Alan y**  
**PORTER, Andrew Justin Radcliffe**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 382 075 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 el tratamiento de una enfermedad bacteriana infecciosa con un anticuerpo contra las moléculas señal derivadas de una antilactona o una lactona

**Campos de la invención**

5 La presente invención se refiere a procedimientos para controlar y tratar infecciones bacterianas en pacientes. Los procedimientos de la invención son aplicables a la mayoría de, si no a todas, las infecciones bacterianas Gram negativas y Gram positivas. La invención posibilita la aplicación de terapias basadas en, en la realización preferida, inmunoglobulina o moléculas receptoras de tipo inmunoglobulina que tienen afinidad y especificidad por moléculas de señalización implicadas en los procesos de comunicación bacteriana de célula a célula. Uniéndose a tales  
10 moléculas, los receptores pueden usarse para diagnosticar la presencia de bacterias o para evaluar la patología de pacientes, y pueden usarse adicionalmente para controlar concentraciones de moléculas implicadas en la inducción de un estado virulento en patógenos oportunistas y otros.

**Antecedentes de la invención**

15 Una de las causas principales de mortalidad y morbilidad entre pacientes que se someten a tratamiento en hospitales en la actualidad se debe a infección adquirida en el hospital. La susceptibilidad a dicha infección puede ser como resultado de la enfermedad primaria para la que se admitió al paciente, de regímenes de tratamiento inmunosupresores, o como consecuencia de lesión que da como resultado daño cutáneo grave, tal como quemaduras. La bacteria a la que se atribuye la mayor proporción de casos es *Pseudomonas aeruginosa*. Es el paradigma de un patógeno oportunista de seres humanos. La bacteria casi nunca infecta tejidos no comprometidos, pero apenas hay ningún tejido que no puede infectar, si las defensas del tejido están comprometidas de alguna  
20 manera. Aunque representa un número relativamente pequeño de especies, supone una amenaza grave para la salud humana y se usa en lo sucesivo como un ejemplo representativo de una bacteria infecciosa.

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista que provoca infecciones del tracto urinario, infecciones del sistema respiratorio, dermatitis, infecciones de tejido blando, bacteriemia y una diversidad de infecciones sistémicas, particularmente en víctimas de quemaduras graves, y en pacientes de cáncer y SIDA que están inmunosuprimidos. Las infecciones respiratorias provocadas por *Pseudomonas aeruginosa* se producen casi exclusivamente en individuos con un tracto respiratorio inferior comprometido o un mecanismo de defensa sistémica comprometida. Se produce neumonía primaria en pacientes con enfermedad pulmonar crónica e insuficiencia cardiaca congestiva. La neumonía bacteriémica se produce habitualmente en pacientes con cáncer neutropénico que se someten a quimioterapia. La colonización del tracto respiratorio inferior de pacientes con fibrosis quística por cepas mucoides de *Pseudomonas aeruginosa* es habitual y difícil, si no imposible, de tratar. Provoca bacteriemia principalmente en pacientes inmunocomprometidos. Las afecciones que predisponen incluyen tumores malignos hematológicos, inmunodeficiencia relacionada con SIDA, neutropenia, diabetes mellitus y quemaduras graves. La mayor parte de la bacteriemia por *Pseudomonas* se adquiere en hospitales y residencias en los que representa aproximadamente el  
25 por ciento de todas las bacteriemias Gram negativas adquiridas en hospital.

La bacteria es conocida por su resistencia natural a muchos antibióticos debido a la barrera de permeabilidad que le aporta su LPS de membrana exterior y es, por lo tanto, un patógeno particularmente peligroso y temido. Además, su tendencia a colonizar superficies en forma de biofilm hace a las células impermeables a concentraciones terapéuticas de antibióticos. Puesto que su hábitat natural es el suelo, viviendo en asociación con los bacilos, actinomicetes y mohos, ha desarrollado resistencia a una diversidad de sus antibióticos de origen natural. Además, *Pseudomonas* spp. mantiene plásmidos de resistencia a antibióticos, tanto factores de resistencia (factores R) como factores de transferencia de resistencia (RTF), y son capaces de transferir estos genes por medio de los procesos bacterianos de transducción y conjugación. Solo unos pocos antibióticos son eficaces contra *Pseudomonas*, incluyendo fluoroquinolona, gentamicina e imipenem, e incluso estos antibióticos no son eficaces contra todas las  
35 cepas. Se ha notificado que las combinaciones de gentamicina y carbenicilina son eficaces en pacientes con infecciones por *Ps. Aeruginosa* agudas. La inutilidad de tratar infecciones por *Pseudomonas* con antibióticos se ilustra de forma más drástica en pacientes con fibrosis quística, prácticamente todos los cuales se infectan con el tiempo con una cepa que es tan resistente que no puede tratarse. Debido a la resistencia a antibióticos, es obligatorio el ensayo de susceptibilidad de aislados clínicos.

40 *Ps. aeruginosa* puede aislarse habitualmente de suelo y agua, así como las superficies de plantas y animales. Se encuentra por todo el mundo, en cualquier lugar en el que aparezcan estos hábitats, de modo que es una bacteria bastante "cosmopolita". En ocasiones está presente como parte de la flora normal de seres humanos, aunque la prevalencia de colonización de individuos sanos fuera del hospital es relativamente baja (las estimaciones varían de 0 a 24 por ciento dependiendo de la situación anatómica). En los hospitales se sabe que coloniza alimentos, pilas, grifos, fregonas, instrumentos quirúrgicos de equipamiento respiratorio. Aunque la colonización habitualmente precede a infecciones por *Ps. aeruginosa*, la fuente exacta y el modo de transmisión del patógeno con frecuencia no están claros debido a su presencia ubicua en el ambiente. Entre los pacientes de cuidados intensivos en los que se sospecha infección por razones clínicas, hasta el 50 % no tienen fuente identificable de infección. En la actualidad, 1.400 muertes en todo el mundo están provocadas cada día por *Ps. aeruginosa* en unidades de cuidados intensivos

(UCI), haciéndolo la causa de muerte principal.

*Ps. aeruginosa* es principalmente un patógeno nosocomial. De acuerdo con el CDC, la incidencia global de infecciones por *Ps. aeruginosa* en los hospitales de Estados Unidos tiene una media de aproximadamente 0,4 por ciento (4 por cada 1000 altas) y la bacteria es el cuarto patógeno nosocomial aislado más habitualmente, representando 10,1 % de todas las infecciones adquiridas en el hospital. Globalmente es responsable del 16 % de los casos de neumonía nosocomiales, 12 % de las infecciones de tracto urinario adquiridas, 8 % de infecciones de herida quirúrgica y 10 % de infecciones del torrente sanguíneo. Los pacientes inmunocomprometidos tales como pacientes de cáncer neutropénico y trasplante de médula ósea son susceptibles de infección por *Ps. aeruginosa* oportunista, lo que conduce al 30 % de las muertes notificadas. También es responsable del 38 % de neumonías asociadas con ventilador y 50 % de muertes entre los pacientes con SIDA. En casos de quemaduras las infecciones por *Ps. aeruginosa* se han reducido en años recientes debido a la mejora del tratamiento y cambios de la dieta. Las tasas de mortalidad sin embargo permanecen altas, representando el 60 % de todas las muertes debido a infección secundaria de pacientes con quemaduras.

Una razón para la versatilidad de *Ps. aeruginosa* es que produce una batería de determinantes de virulencia diversos, incluyendo elastasa, proteasa LasA, proteasa alcalina, ramnolípidos, movilidad de contracción mediada por pelo de tipo IV, pioverdina (Williams y col., 1996, Stintzi y col., 1998, Glessner y col., 1999), piocianina (Brint & Ohman, 1995, Reimann y col., 1997) y las lectinas citotóxicas PA-I y PA-II (Winzer y col. 2000). Se sabe ahora que muchos de estos determinantes de virulencia se regulan al nivel genético de una manera dependiente de densidad celular a través de sensibilidad de quórum. *Ps. aeruginosa* posee al menos dos sistemas de sensibilidad de quórum, concretamente los sistemas *las* y *rhl* (*vsm*) que comprenden los homólogos de LuxRI LasRI (Gambello & Iglewski, 1991) y Rh1RI (VsmRI) (Latif y col., 1995) respectivamente (Figura 2). LasI dirige la síntesis de 3-oxo-C12-HSL (Passador y col., 1993, Pearson y col., 1994), mientras que RH1I 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 control transcripcional sobre Rh1R (Williams y col., 1996, Pesci y col., 1997). El activador transcripcional LasR actúa junto con 3-oxo-C12-HSL para regular la expresión de los genes que codifican los determinantes de virulencia elastasa, LasA proteasa, 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 colágeno, anticuerpos IgG e IgA, complemento y facilita la adhesión bacteriana a mucosa del pulmón. En combinación con proteasa alcalina también provoca inactivación de interferón gamma (INF) y factor de necrosis tumoral (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 transcripcional Rh1R, junto con su AHL afín (C4-HSL), regula la expresión de *rhlAB* (ramnolípidos), *lasB*, *aprA*, RpoS, cianuro, piocianina y las lectinas PA-I y PA-II (Ochsner y col., 1994, Brint & Ohman, 1995, Latif y col., 1995, Pearson y col., 1995, Winson y col., 1995, Latif y col., 1996, Winzer y col., 2000). Estos existen de una manera jerárquica por lo que LasR/3-oxo-C12-HSL regula *rhlR* (Latif y col., 1996, Pesci y col., 1997) y en consecuencia ambos sistemas se requieren para la regulación de todos los determinantes de virulencia anteriores.

Se investigan activamente varios enfoques diferentes para desarrollar agentes terapéuticos para el tratamiento o prevención de infección por *Ps. aeruginosa*. Se pretende que algunos sean de amplio espectro mientras que otros se dirigen a tipos específicos de infección por *Pseudomonas*. Los que siguen las vías tradicionales incluyen el desarrollo de vacunas tales como las descritas en la patente de Estados Unidos N° 6.309.651 y un nuevo fármaco antibiótico (SLIT) que se espera que sea eficaz contra bacterias Gram negativas en general pero está diseñado principalmente para actuar contra *Ps. aeruginosa* y se administra por inhalación de aerosol. Una observación adicional que está siendo investigada es que el antibiótico eritromicina administrado a concentraciones inhibitoras del crecimiento subóptimas suprime simultáneamente la producción de hemaglutininas, hemolisina, proteasas y homoserina lactonas (HSL) de *Ps. Aeruginosa* y puede ser aplicable para el tratamiento de infección por *Ps. aeruginosa* persistente. Las formulaciones de crema que contienen péptidos anfipáticos también se están examinando como un posible medio para evitar infección de quemaduras u otras heridas cutáneas graves. La patente de Estados Unidos 6.309.651 también enseña que los anticuerpos contra la proteína de virulencia de PcrV de *Ps. aeruginosa* puede proporcionar protección contra 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 acil-homoserina lactonas (AHL) tales como furanonas (Manefield, 1999), así como algunas plantas terrestres. Estos compuestos desplazan la molécula señal AHL de su proteína receptora y pueden actuar como agonista o antagonista en bioensayos de AHL (Tepletski y col., 2000). Otros procedimientos empleados para reducir la concentración de HSL incluyen el desarrollo de enzimas de inactivación auto-inductoras (AiiA) que catalizan la degradación de HSL.

Existen varios problemas potenciales y limitaciones asociados con las terapias que se están desarrollando actualmente. Aún no se ha demostrado si las vacunas serán tratamientos eficaces. *Ps. aeruginosa* produce una cápsula mucoide extensiva que protege eficazmente contra la opsonización por anticuerpos del huésped, como se reveló por pacientes con infecciones persistentes que tenían altas titulaciones en suero de anticuerpos anti *Pseudomonas*. Una limitación en la aplicabilidad de tratamientos tales como vacunas y anticuerpos anti-PcrV, como se describe en la patente de Estados Unidos 6.309.651, es que estos enfoques se restringen a infección por *Pseudomonas*, y no serían eficaces contra otras bacterias. El uso de miméticos auto-inductores está limitado por las concentraciones de la mayoría que se requieren para competir eficazmente contra HSL por el sitio de unión al

receptor, y la posibilidad de efectos secundarios. Se conoce bien que las HSL liberadas por *Pseudomonas* y otras bacterias tienen varios efectos directos sobre la fisiología humana. Estos incluyen inhibición de liberación de histamina como se describe en el documento WO 01/26650. El documento WO 01/74801 describe que las HSL también son capaces de inhibir proliferación de linfocitos y regular negativamente la secreción de TNF- $\alpha$  por monocitos y macrófagos, actuando de este modo como un inmunosupresor general. Existe por lo tanto un peligro de que las terapias que implican el uso de miméticos de HSL competitivos puedan dar como resultado regulación negativa del sistema inmune del paciente. En general esto no sería deseable, y particularmente en pacientes inmunocomprometidos. El uso de antibióticos puede, en el mejor de los casos, verse como una estrategia a corto plazo a la vista de la notable capacidad de esta bacteria (y otras) para desarrollar resistencia a antibióticos.

Se subraya que la patogénesis de *Ps. aeruginosa* es claramente multifactorial por el gran número de factores de virulencia y el amplio espectro de las enfermedades asociadas con esta bacteria. Muchos de los factores de virulencia extracelular requeridos para invasión de tejido y diseminación están controlados por sistemas de señalización de célula a célula que implican moléculas señal basadas en homoserina lactona y proteínas activadoras transcripcionales específicas. Estos sistemas reguladores permiten que *Ps. aeruginosa* se adapte a una forma virulenta de una manera dependiente de densidad celular coordinada, y que supere los mecanismos de defensa del huésped. La interferencia con dicha señalización celular y la producción asociada de factores de virulencia es un enfoque terapéutico prometedor para reducir enfermedad y muerte causadas por *Ps. aeruginosa*. La importancia de tales enfoques se remarca por el número creciente de patógenos bacterianos que se ha descubierto que utilizan sistemas de señalización de célula a célula similares.

Para estudiar la base molecular de las interacciones patógeno-huésped, es deseable tener disponible un sistema modelo adecuado (no humano) en el que los estímulos y mecanismos relacionados con patogenicidad en seres humanos puedan replicarse. En el caso de muchas enfermedades el patógeno implicado está asociado de forma intrínseca con una o unas pocas especies o grupos cercanamente relacionados, por ejemplo, VIH. Otros organismos pueden provocar enfermedad en una amplia serie de huéspedes, cruzando las barreras de especie, género e incluso reino. *Ps. aeruginosa* es un patógeno tal, que es capaz de infectar una diversidad de especies vegetales, de insectos y animales.

En años recientes se ha demostrado que las cepas de *Ps. aeruginosa* que son capaces de provocar enfermedades en seres humanos y ratones también son capaces de destruir el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans* (Tan y col., 1999a, Tan y col., 1999b, Tan y col., 2000). Resulta más importante que la patogenicidad de *Ps. aeruginosa* para *C. elegans* se regula por los mismos sistemas de sensibilidad de quórum dependientes de densidad celular que la patogénesis de control en seres humanos. La reciente compleción de la secuenciación de los genomas tanto de *Ps. aeruginosa* como de *C. elegans* hacen esta relación ideal para el estudio de mecanismos de enfermedad bacteriana. El hecho de que el 36 % de las proteínas de *C. elegans* también tengan homólogos en seres humanos (Darby y col., 1999) y la facilidad con la que puede criarse *C. elegans* en el laboratorio, han conducido a su uso generalizado como un modelo para patogénesis y defensas de huésped en seres humanos (Kurz y Ewbank, 2000).

Se ha identificado una diversidad de diferentes mecanismos por los que *Ps. aeruginosa* media en la muerte de *C. elegans*. Tan y col., 1999a; 1999b y Majan-Miklos y col., 1999, describen el uso de un aislado clínico (cepa PA14) que también infecta a ratones y plantas. Variando las condiciones de crecimiento de las bacterias, la aplicación posterior a *C. elegans* puede dar como resultado muerte rápida (en un período de horas) o muerte lenta (en un período de 3 a 4 días). El mecanismo de muerte rápida depende solamente del sistema de sensibilidad del quórum de Rhl. Además, el uso de medio sin células en el que se ha dejado crecer de forma apropiada *Ps. aeruginosa*, o extractos muertos por calor son igualmente eficaces puesto que la muerte se efectúa por toxina piocianina difundible. Por el contrario el mecanismo de muerte lenta se basa en los sistemas tanto Las como Rhl y da como resultado infección significativa del intestino del nematodo. Puesto que la muerte es probablemente un resultado de infiltración del huésped por las bacterias, este ensayo proporciona el modelo de nematodo más útil para infección en animales. Se ha descrito un tercer mecanismo de muerte por Darby y col., (1999). Aquí el uso de la cepa de *Ps. aeruginosa* PA01 (un patógeno humano conocido) cultivada en medio de infusión de cerebro-corazón da como resultado parálisis rápida y muerte de *C. elegans*. Como con la muerte lenta descrita anteriormente, la parálisis depende de sistema tanto Las como Rhl.

La solicitud de patente internacional WO 01/94543 desvela análogos de moléculas autoinductoras que se derivan para permitir su unión con otras moléculas y superficies. Este documento también desvela procedimientos para usar los compuestos para producir composiciones que pueden ser útiles para tratar y prevenir enfermedades.

El documento US 6.395.282 desvela conjugados inmunogénicos que comprenden una molécula vehículo conjugada con una bacteria gram negativa autoinductora. El conjugado inmunogénico, cuando se combina con un vehículo farmacéuticamente aceptable, puede ser útil como una vacuna para mamíferos para evitar infección por las bacterias gram negativas.

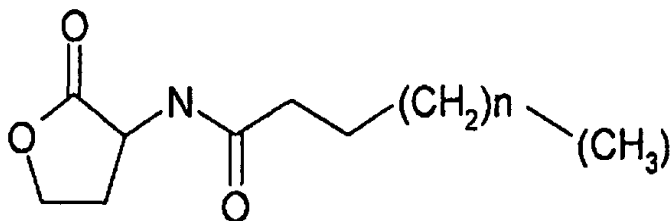
Existe la necesidad de desarrollar medios eficaces para modular las concentraciones de HSL y otras moléculas de señalización de células bacterianas implicadas en patogenicidad por procedimientos que no tienen efectos secundarios adversos, y es poco probable se eviten por las bacterias patogénicas en el futuro cercano.

**Sumario de la invención**

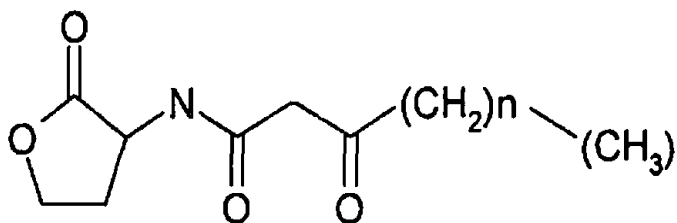
Los aspectos de la presente invención son como se expone en las reivindicaciones. En particular, la presente invención proporciona procedimientos para controlar la virulencia de bacterias patogénicas humanas, animales y vegetales regulando las concentraciones extracelulares de moléculas de señalización de células bacterianas.

5 Mientras que otros tratamientos se restringen a un patógeno o grupo de patógenos particular o a aspectos específicos de la virulencia bacteriana, la presente invención aborda la virulencia bacteriana en general.

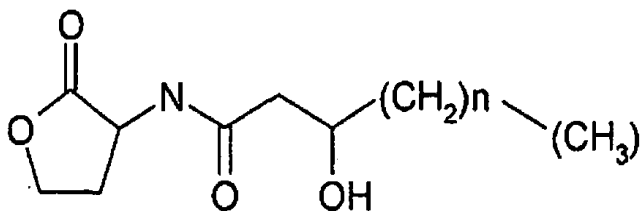
De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para explorar una biblioteca de presentación de fagos humanos vírgenes con respecto a un anticuerpo monoclonal antibacteriano específico para una molécula de señalización bacteriana, comprendiendo el procedimiento conjugar una molécula  
 10 seleccionada del grupo que consiste en una molécula de homoserina lactona de la fórmula general:



Fórmula I



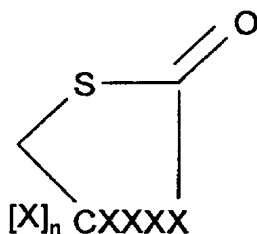
Fórmula II



15

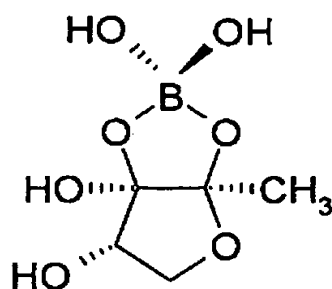
Fórmula III

en la que n = 0 a 12,  
 una péptido tiolactona de fórmula general (IV):

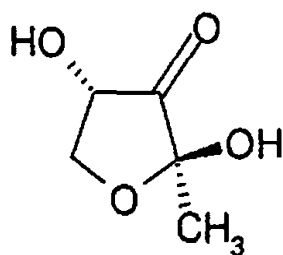


20

en la que X es cualquier aminoácido y n = 1 a 10;  
 o auto-inductor 2 (AI-2),



o Pro-AI-2 o un derivado de ácido carboxílico insaturado o saturado C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> del mismo



5 con una molécula vehículo, explorar la biblioteca para generar una biblioteca enriquecida, y explorar dicha biblioteca enriquecida frente a la misma molécula de señalización bacteriana conjugada con una segunda molécula vehículo diferente para identificar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la forma soluble libre de la homoserina lactona, péptido tiolactona, AI-2 o Pro-AI-2 o un derivado de ácido carboxílico insaturado o saturado C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> de la misma de la biblioteca de presentación de fagos humanos vírgenes en presencia de derivados conjugados de los mismos.

10 También se proporciona un anticuerpo de cadena sencilla (scAb) de los clones de *E. coli* G3H5, G3B12, G3 G2 o G3H3 depositados como NCIMB-41167, NCIMB-41168, NCIMB-41169 y NCIMB-41170 respectivamente.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de cadena sencilla (scAb) de los clones de *E. coli* G3H5, G3B12, G3G2 o G3H3 depositados como NCIMB-41167, NCIMB-41168, NCIMB-41169 y NCIMB-41170 respectivamente.

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

25 Están ahora bien desarrolladas en la materia técnicas para producir anticuerpos monoclonales y policlonales que se unen a una proteína particular. Se analizan en libros de texto de inmunología convencionales, 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 a antígeno. Por lo tanto la presente invención incluye fragmentos de anticuerpo y construcciones sintéticas. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo y construcciones sintéticas se proporcionan por Dougall y col en Tibtech 12 372-379 (septiembre de 1994). Los fragmentos de anticuerpo incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv (véase Roitt y col [mencionado anteriormente]). Los fragmentos Fv pueden modificarse para producir una construcción sintética conocida como una molécula Fv de cadena sencilla (scFv). Esta incluye un engarce peptídico que une covalentemente regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que contribuyen a la estabilidad de la molécula. La presente invención también se extiende por lo tanto a anticuerpos de cadena sencilla o scAb.

35 Otras construcciones sintéticas incluyen péptidos de CDR. Estos son péptidos sintéticos que comprenden determinantes de unión a antígeno. También pueden usarse miméticos peptídicos. Estas moléculas son habitualmente anillos orgánicos conformacionalmente restringidos que imitan la estructura de un bucle de CDR y que incluyen cadenas laterales que interactúan con antígenos. Las construcciones sintéticas también incluyen moléculas quiméricas. Por lo tanto, por ejemplo, los anticuerpos humanizados (o primatizados) o derivados de los mismos están dentro del alcance de la presente invención. Un ejemplo de un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene regiones flanqueantes humanas, pero regiones hipervariables de roedor. Las construcciones sintéticas también incluyen moléculas que comprenden un resto ligado covalentemente que proporciona la molécula

con alguna propiedad deseable además de unión a antígeno. Por ejemplo el resto puede ser un marcador (por ejemplo, un marcador detectable, tal como un marcador fluorescente o radiactivo) o un agente farmacéuticamente activo.

5 Para generar anticuerpos anti moléculas señal bacterianas, es preferible conjugar la molécula diana, o un derivado adecuado, con dos molécula vehículo diferentes (proteínas). Las moléculas señal bacterianas, en general, son demasiado pequeñas para estimular una respuesta inmune *in vivo*, o para usarse directamente como una fuente de antígeno para la selección de anticuerpos de alta afinidad de bibliotecas de anticuerpos. La selección de anticuerpos específicos para la molécula de señalización celular (en lo sucesivo denominada "antígeno") se lleva a cabo en la realización preferida usando un repertorio (biblioteca) de primeros miembros de pares de unión específicos (sbp), por ejemplo una biblioteca de anticuerpos presentados en la superficie de bacteriófago filamentoso. Pueden seleccionarse clones específicos de moléculas señal a partir de un panel de líneas celulares de hibridoma secretoras de anticuerpo generadas a partir de un animal inmunizado con un conjugado de antígeno. Para los fines de una ilustración general se usará el ejemplo de una biblioteca de sitios de unión a anticuerpo presentados en partículas de fago.

15 Un conjugado que comprende una antígeno acoplado a un molécula vehículo adecuada, que puede ser una proteína, un péptido o cualquier compuesto o material natural o sintético (denominado en lo sucesivo en el presente documento "conjugado-1") se inmoviliza en un soporte sólido adecuado tal como un "inmunotubo" o placa de microtitulación, y la superficie no revestida se bloquea con una agente de bloqueo no específico tal como leche en polvo. Las moléculas conjugadas adecuadas pueden incluir, pero sin limitación, proteínas tales como albúmina de suero bovino (BSA), Hemocianina de Lapa Californiana (KLH), Tiroglobulina Bovina (TG), Ovoalbúmina (Ova) o no proteínas tales como biotina. La única restricción en la selección de la molécula conjugada es que puede inmovilizarse de alguna manera y para la inmunización es suficientemente grande para inducir una respuesta inmune.

25 Se aplica una biblioteca de primeros miembros de pares de unión específicos (sbp) ("la biblioteca") al conjugado inmovilizado y se incuba durante el tiempo suficiente para que los miembros de sbp reconozcan conjugado-1 para unirse. Los fagos que no reconocen el conjugado se retiran por lavado riguroso. Los fagos que permanecen unidos se eluyen, por ejemplo con trietilamina u otro reactivo adecuado, a una solución de tampón para restaurar el pH neutro. Las partículas de fago recuperadas se usan después para infectar un organismo huésped adecuado, por ejemplo bacterias *E. coli*, y se cultivan para amplificar los números de cada miembro seleccionado y generar de este modo una segunda biblioteca "enriquecida". El procedimiento se repite después usando la biblioteca enriquecida para seleccionar anticuerpos de fago ("fagos") que reconocen el antígeno conjugado con una segunda proteína vehículo (conjugado-2).

35 Se realizan ciclos adicionales según se requiera, alterándose el procedimiento de selección para favorecer la selección de los miembros de sbp que reconozcan la forma libre del antígeno. Se seleccionan fagos contra conjugados de antígeno como se ha descrito previamente, usando inicialmente conjugado-1, y alternando con conjugado-2 (cuando esté disponible) para cada ciclo posterior. Los fagos unidos se eluyen incubando con una solución de antígeno libre o antígeno conjugado con restos seleccionables solubles pequeños, por ejemplo biotina, durante un tiempo suficiente para que los miembros de sbp con mayor afinidad por la forma unida del antígeno se disocien del conjugado inmovilizado. Los fagos eluidos con antígeno libre se usan para infectar células *E. coli* para amplificación y re-selección, y los que permanecen unidos al antígeno inmovilizado se descartan. Como alternativa, pero menos preferentemente, todos los anticuerpos que se unen a conjugado pueden eluirse por ejemplo con pH bajo.

45 Los clones de fagos individuales (monoclonales) de cada ciclo de selección se exploran con respecto a características de unión deseadas. Esto puede realizarse por una diversidad de procedimientos que serán conocidos para los expertos habituales en la materia, dependiendo de los requisitos, incluyendo tales técnicas como SPR (Resonancia de Plasmón Superficial) y ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima). Los criterios de selección incluirán la capacidad para unirse preferentemente a la forma soluble libre del antígeno en presencia de derivados de conjugado.

50 En la realización preferida de la invención, se generarán anticuerpos a partir de una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpo humano virgen (McCafferty y col., Nature 348: 552-554, 1990; y como se describe en el documento WO 92/01047). Por lo tanto los anticuerpos podrían usarse para administración a pacientes además de su uso como reactivos de diagnóstico o diálisis. En un ensayo de diagnóstico el anticuerpo podría usarse para determinar la presencia y concentración de HSL en pacientes y predecir de este modo el estado de infección del paciente. Pueden construirse bibliotecas a partir de un animal pre-inmunizado con uno o más conjugados de una HSL y una molécula vehículo adecuada. También pueden generarse líneas celulares de hibridoma de un animal inmunizado como se ha descrito anteriormente. En los últimos dos casos es preferible que se tomen medidas para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos resultantes, por ejemplo creando anticuerpos quiméricos de animal huésped-humano, o "humanización" por injerto de CDR en un armazón marco de anticuerpo adecuado. Otros procedimientos aplicables incluirán la identificación de epitopos de linfocitos T potenciales dentro del anticuerpo y la retirada posterior de estos, por ejemplo por mutagénesis dirigida (des-inmunización). En una realización adicional el anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética para incluir regiones constantes de diferentes clases de

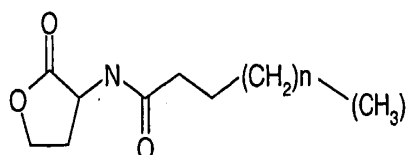
inmunoglobulina humana (IgG, IgA, etc.) y producirse como una molécula de anticuerpo completa en células animales. En particular estos enfoques son deseables cuando van a usarse anticuerpos de forma terapéutica.

5 Para la presente invención, el anticuerpo puede ser monoclonal. Los anticuerpos pueden ser humanos o humanizados, o para aplicaciones de diagnóstico pueden ser de otra especie. Pueden usarse fragmentos de anticuerpo o derivados, tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub> (también escrito como F(ab')<sub>2</sub>), Fv o scFv, así como anticuerpos de cadena sencilla (scAb) tales como los descritos por Huston y col. (Int. Rev. Immunol. 10: 195-217, 1993), anticuerpos de dominio (dAb), por ejemplo un anticuerpo de dominio sencillo, o receptores de unión a antígeno de dominio sencillo de tipo anticuerpo. Además de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y moléculas de tipo inmunoglobulina, pueden diseñarse peptidomiméticos o miméticos no peptídicos para imitar la actividad de unión de anticuerpos en la prevención o modulación de infección bacteriana inhibiendo la unión de moléculas de señalización celular.

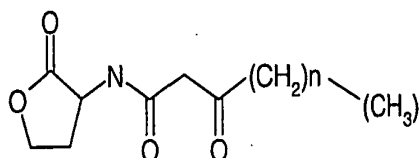
10 Después de la preparación de un anticuerpo adecuado, este puede aislarse o purificarse por una de varias técnicas habitualmente disponibles (por ejemplo, como se describe en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)). Las técnicas generalmente adecuadas incluyen 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 de acuerdo con procedimientos convencionales, y ensayarse con respecto a especificidad usando procedimientos generalmente disponibles, incluyendo ELISA, ABC, ensayos de transferencia puntual, etc.

La molécula de señal de lactona puede ser una molécula de homoserina o una molécula de péptido tiolactona.

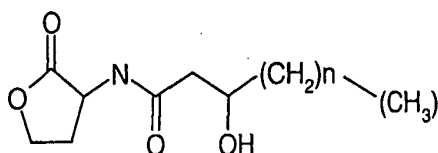
20 La molécula de homoserina lactona puede tener una fórmula general seleccionada del grupo que consiste en:



Fórmula I



Fórmula II



Fórmula III

en la que  $n = 0$  a 12.

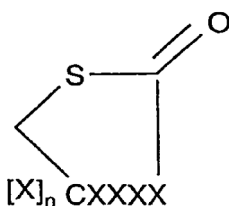
25 Los compuestos de fórmula general I pueden describirse como moléculas de acil-homoserina lactona. Los compuestos de fórmula general II pueden describirse como 3-oxo-homoserina lactonas. Los compuestos de la fórmula general III pueden describirse como 3-hidroxi-homoserina lactonas.

30 Las moléculas de homoserina lactona preferidas para fórmula general I son *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  $n = 10$ . Las moléculas de homoserina lactona preferidas para fórmula general II son *N*-(-3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (OHHL) en la que  $n = 2$  y *N*-(-3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (OdDHL) en la que  $n = 8$ . Las moléculas de homoserina lactona preferidas para fórmula general III son *N*-(-3-hidroxi-butanoil)-L-homoserina lactona (HBHL) en la que  $n = 0$ .

35 En general las HSL bacterianas pueden subdividirse adicionalmente en dos clases: i) moléculas de cadena larga (10-12 carbonos) y ii) moléculas de cadena corta (4-8 carbonos). En *Pseudomonas* sp. estas clases de diferente tamaño se unen a diferentes moléculas R y provocan que se activen diferentes genes. Las moléculas de cadena larga se unen al producto génico homólogo de R conocido como LAS y las moléculas de cadena corta con el homólogo de proteína RHL.

El péptido tiolactona puede tener una fórmula general (IV) como sigue:





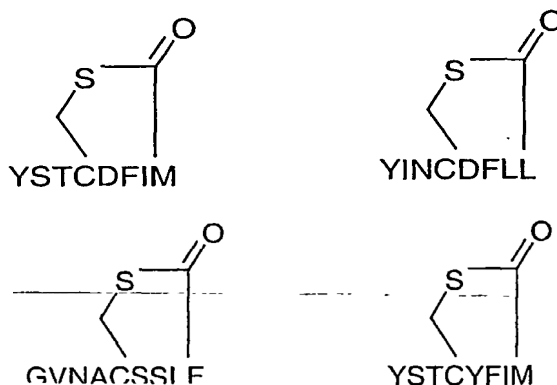
en la que X es cualquier aminoácido y n = 1 a 10.

En lo anterior, y a lo largo de la presente memoria descriptiva, los restos aminoácidos se designan por la nomenclatura de una letra habitual de IUPAC. Las designaciones de una letra pueden correlacionarse con las designaciones de tres letras clásicas de los restos aminoácidos como sigue:

5

A = Ala    G = Gly    M = Met    S = Ser  
 C = Cys    H = His    N = Asn    T = Thr  
 D = Asp    I = Ile    P = Pro    V = Val  
 E = Glu    K = Lys    Q = Gln    W = Trp  
 F = Phe    L = Leu    R = Arg    Y = Tyr

Las moléculas de péptido tiolactona preferidas pueden tener las siguientes estructuras:



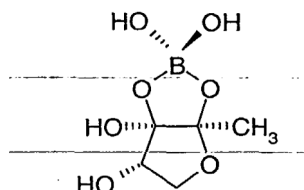
10

Se está descubriendo que un número creciente de especies bacterianas se comunican entre células usando una diversidad de moléculas señal pequeñas. Las bacterias gram-negativas usan predominantemente *N*-acil homoserina lactonas (Tabla 1). Estas últimas son un grupo de compuestos que comparten una estructura de anillo de homoserina lactona común y varían en la longitud y estructura de una cadena lateral (Figura 1a). Estas son tres clases dentro del grupo, las acil-homoserina lactonas, las 3-oxo-homoserinas lactonas y las 3-hidroxi-homoserinas lactonas. Una especie sencilla puede producir y responder a miembros de más de una clase.

15

La molécula señal derivada de lactona puede ser furanosil borato diéster, por ejemplo, AutoInductor-2 o AI-2, Pro-AI-2 o un hapteno sensible a Pro-AI-2 (Figura 1b). Muchos organismos gram negativos y gram positivos tales como *Vibrio harveyi* y *Bacillus anthracis* producen una segunda molécula señal, AI-2, que deriva de la misma fuente de S-Adenosilmetionina como homoserina lactonas, y se une al receptor LuxP (Figura 1b). Se cree que es probable que AI-2 sea una molécula señal bacteriana universal, que se produce y reconoce por e induce violencia en una amplia diversidad de especies.

20



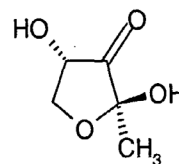
Auto Inductor-2 (AI-2)

AI-2 puede describirse como 2,3-dihidroxi-4-metil-3,4-borato diéster.

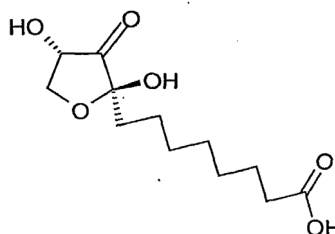
Una molécula señal derivada de lactona también puede ser un derivado de 4,5-dihidroxi-2,3-pentanediona (DPD) que se ciclan de forma natural para formar Pro-AI-2, que reacciona de forma natural con ácido bórico para formar AI-

2 (Figura 1b). Pro-AI-2 puede describirse como 2,4-dihidroxi-4-metil-furan-3-ona. Pro-AI-2 puede derivatizarse como se muestra en la Figura 1b en la posición 4-metilo para añadir un resto de ácido heptanoico para formar un hapteno sensible a Pro-AI-2. Otros derivados pueden incluir otros restos de ácido carboxílico C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> saturados o insaturados, ramificados o de cadena lineal, tales como ácido metanoico,etanoico, propanoico, pentanoico, hexanoico, heptanoico, octanoico, nonanoico o decanoico.

Pro AI-2



Hapteno sensible a Pro AI-2



Bacterias gram-positivas tales como *Staphylococcus aureus* usan péptidos cortos (Figura 1c) (Mayville y col., 1999). Las células usan las moléculas como medio para determinar la densidad celular local, de modo que en condiciones de baja densidad celular la concentración de molécula señal sea correspondientemente baja. En densidades celulares altas la concentración de molécula señal local es alta. Cuando esta concentración alcanza un nivel umbral induce la transcripción de genes implicados en virulencia y la aparición de una patología en el huésped.

Las moléculas señal peptídicas derivatizadas de tiolactona usadas por *Staphylococcus* spp. tienen funciones biológicas adicionales. Estas no solamente proporcionan a las bacterias información sobre su densidad de población local, sino que también actúan para suprimir virulencia en otros *S. aureus* que pertenecen a diferentes sub-grupos (Lyon y col., 2000). Esta bi-funcionalidad se divide entre los diferentes elementos estructurales del péptido, inhibiendo la tiolactona C-terminal la virulencia en otros sub-grupos. El extremo N-terminal no modificado actúa como la señal para regular positivamente la expresión de genes de virulencia en el sub-grupo que lo sintetizó, pero solo junto con el extremo C-terminal, que también se requiere. La presencia de un péptido truncado que comprende los 5 aminoácidos C-terminales con engarce de tiolactona suprime no solamente los otros 3 sub-grupos, sino también la cepa que lo produjo. Por lo tanto se entiende que un anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal del péptido señal, y presenta eficazmente el extremo C-terminal dejándolo expuesto, suprimirá eficazmente la virulencia en todas las cepas de *S. aureus*. Los anticuerpos de la presente invención pueden por lo tanto inducirse contra un epítipo presentado por la molécula de tiolactona como se ha descrito anteriormente o un elemento estructural de la misma, por ejemplo la secuencia peptídica o el resto de tiolactona.

En ciertas realizaciones preferidas de la invención, los anticuerpos son scAb, en particular scAb que se obtienen de clones de *E. coli* designados como XL1-Blue G3H5, G3B12, G3G2 y/o G3H3. Los clones se han depositado en NCIMB, Aberdeen, Reino Unido el 18 marzo de 2003 según 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 medio LB complementado con ampicilina 100 µg/ml, opcionalmente complementado con tetraciclina 12,5 µg/ml y/o glucosa 1 %, en condiciones convencionales de 37 °C en aire.

Se están descubriendo moléculas de señalización bacteriana en cada organismo para el que se buscan. Parece ser un sistema ubicuo, aplicable a todas las especies. Las principales diferencias son que todas las bacterias gram negativas (gram -ve) usan moléculas basadas en homoserina lactona, y las bacterias gram positivas (gram +ve) usan péptidos pequeños (modificados). Muchos organismos gram negativos y gram positivos tales como *Vibrio harveyi* y *Bacillus anthracis* (Jones, M.B. y Blaser, M.J.) también usan una molécula orgánica que contiene boro pequeña AI-2 (AutoInductor-2) que, como las homoserinas lactonas, deriva de S-Adenosilmetionina. Trabajos previos en este campo se han concentrado en imitar moléculas señal con unas que se reconocen pero que no actúan, es decir sin conmutación patogénica, o en bloquear los diversos sistemas de receptor. Las desventajas de estos procedimientos son principalmente que puede desarrollarse resistencia al mimético o bloqueo y la molécula señal "real" aún permanece y competirá por la unión. Además, algunas moléculas de señalización bacterianas, por ejemplo, homoserina lactonas, son factores de virulencia por sí mismas, y pueden provocar directamente inmunosupresión del huésped (es decir paciente). La esencia de la presente invención es dirigirse a la molécula señal real, y esto puede aplicarse a todos los sistemas de señalización de célula a célula bacterianos (gram negativos y gram positivos). Este enfoque tiene una ventaja clave e importante frente a todos los intentos anteriores en el campo por que las bacterias no reconocerán que están siendo atacadas, simplemente detectaran que están solas. No habrá ninguna presión selectiva para resistencia.

También se desvela una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como se identifica por el procedimiento del primer aspecto de la invención.

5 Tales composiciones pueden prepararse por cualquier procedimiento conocido en la técnica de la farmacia, por ejemplo mezclando el principio activo con un vehículo o vehículos, diluyente o diluyentes o excipiente o excipientes en condiciones estériles.

10 La composición farmacéutica puede adaptarse para administración por cualquier vía apropiada, por ejemplo por la vía oral (bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Tales composiciones pueden prepararse por cualquier procedimiento conocido en la técnica de la farmacia, por ejemplo mezclando el principio activo con el vehículo o vehículos o excipiente o excipientes en condiciones estériles.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas o comprimidos; como polvos o gránulos; como soluciones, jarabes o suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos; o como espumas o batidos comestibles; o como emulsiones).

15 Los excipientes adecuados para comprimidos o cápsulas de gelatina duras incluyen lactosa, almidón de maíz o derivados de los mismos, ácido esteárico o sales de los mismos.

Los excipientes adecuados para su uso con cápsulas de gelatina blandas incluyen por ejemplo aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semi-sólidos o líquidos, etc.

20 Para la preparación de soluciones y jarabes, los 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 agua en aceite.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos que se pretende que permanezcan en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, el principio activo puede suministrarse desde el parche por iontoforesis como se describe en general en *Pharmaceutical Research*, 3 (6), página 318 (1986).

25 Pueden formularse composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles o aceites. Para infecciones del ojo u otros tejidos externos, por ejemplo boca y piel, las composiciones se aplican preferentemente como una pomada tópica o crema. Cuando se formula en una pomada, el principio activo puede emplearse con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Como alternativa, el principio activo puede formularse en una crema con una  
30 base de crema de aceite en agua o una base de agua en aceite. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica al ojo incluyen colirios en los que el principio activo está disuelto o suspendido en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar, pastillas y enjuagues bucales.

35 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración rectal pueden presentarse como supositorios o enemas.

40 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración nasal en las que el vehículo es un sólido incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño partícula por ejemplo en el intervalo de 20 a 500 micrómetros que se administra de la misma manera en que se toma el rapé, es decir, por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz. Las composiciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido, para administración como una pulverización nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del principio activo.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración por inhalación incluyen brumas o polvos de partículas finas que pueden generarse por medio de diversos tipos de aerosoles presurizados con dosis medida, nebulizadores o insufladores.

45 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización.

50 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen solución de inyección estéril acuosa y no acuosa que puede contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación sustancialmente isotónica con la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Los excipientes que pueden usarse para soluciones inyectables incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Las composiciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo ampollas selladas y frascos y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden  
55 prepararse soluciones y suspensiones de inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y

comprimidos.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes conservantes, agentes solubilizantes, agentes estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, odorantes, sales (las sustancias de la presente invención pueden por sí mismas proporcionarse en forma de una sal farmacéuticamente aceptable), tampones, agentes de revestimiento o antioxidantes. También pueden contener agentes terapéuticamente activos además de la sustancia de la presente invención.

Las dosificaciones de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar entre límites amplios, dependiendo de la enfermedad o trastorno a tratar, la edad y condición del individuo a tratar etc. y un médico determinará en última instancia las dosificaciones apropiadas para usar.

10 Tales composiciones pueden formularse para medicina humana o veterinaria. La presente solicitud debe interpretarse como de igual aplicación a seres humanos y a animales, a no ser que el contexto claramente implique otra cosa.

También se desvela un procedimiento para el tratamiento de infección bacteriana de un sujeto, comprendiendo el procedimiento administración de un anticuerpo identificado por el procedimiento de la invención al sujeto.

15 Se muestran ejemplos de bacterias que se ha descubierto que provocan patologías en la Tabla 1. Los procedimientos de este aspecto de la divulgación se extienden por lo tanto a un procedimiento de tratamiento de una infección por una cepa de bacterias como se muestra en la Tabla 1 en un sujeto. También se desvela un procedimiento de tratamiento de una infección de *Pseudomonas aeruginosa* en un sujeto.

20 Las sustancias terapéuticas de la presente invención pueden usarse en el tratamiento de un animal humano o no humano. El tratamiento puede ser profiláctico o puede ser con respecto a una afección existente.

El anticuerpo habitualmente se proporcionará como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del procedimiento deseado de administración a un paciente).

25 Puede proporcionarse en forma farmacéutica unitaria, se proporcionará generalmente en un recipiente sellado y puede proporcionarse como parte de un kit. Un kit de partes tal normalmente (aunque no necesariamente) incluiría instrucciones para su uso. Puede incluir una pluralidad de dichas formas farmacéuticas unitarias.

30 Los procedimientos de la invención pueden aplicarse a dolencia/enfermedad aguda o crónica a corto o largo plazo y son eficaces contra la mayoría o todos los patógenos bacterianos de plantas, animales, incluyendo seres humanos. La invención también puede usarse como un tratamiento profiláctico para la prevención de aparición de enfermedad en individuos en riesgo de o con exposición a bacterias patógenas. La invención también tiene el potencial de limitar o prevenir la regulación negativa del sistema inmune que resulta de muchas infecciones, y es de interés particular para pacientes que padecen cáncer, fibrosis quística, SIDA y otras afecciones inmunosupresoras. Además, puesto que los procedimientos de la invención se dirigen particularmente a moléculas de señalización de células bacterianas, y no principalmente a las células bacterianas en sí mismas, no habrá presión selectiva ejercida sobre poblaciones bacterianas para desarrollar resistencia a los tratamientos descritos.

35 El anticuerpo puede administrarse a pacientes infectados para modular y reducir la infección bacteriana. Este puede incluir inhalación del anticuerpo en un aerosol por pacientes con fibrosis quística para aumentar la esperanza de vida.

40 En otra realización más el anticuerpo se administra a pacientes inmuno-suprimidos para aumentar la inmunocompetencia.

En otra realización más pueden administrarse conjugados de moléculas de señalización celular con proteínas inmunogénicas a individuos o pacientes para estimular una respuesta inmune contra la molécula de señalización dando como resultado la generación de anticuerpos neutralizadores.

45 En otra realización más el anticuerpo se usa como un reactivo de inmuno-diagnóstico para detectar la presencia de, y/o estado patogénico de patógenos potenciales, por ejemplo en el torrente sanguíneo o fluidos pleurales de los pacientes.

En otra realización, más el anticuerpo se usa como un reactivo de inmuno-captura para retirar selectivamente moléculas de señalización de células bacterianas de la sangre del paciente en una forma de diálisis.

50 En otra realización más pueden aplicarse procedimientos alternativos a la retirada de moléculas de señalización célula-célula bacterianas de la sangre de un paciente con la intención de modular la patogenicidad y virulencia de microorganismos infecciosos. Esto puede conseguirse con otros receptores naturales o moléculas basadas en receptores naturales que se unen a dichas moléculas señal. Como alternativa pueden aplicarse receptores no naturales tales como polímeros impresos molecularmente (MIP). Ya se ha mostrado que esta clase de receptor es capaz de unirse específicamente a 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). En una alternativa adicional puede conseguirse diálisis por la retirada no específica de todas las moléculas de bajo peso molecular de la sangre del paciente como en diálisis de riñón.

5 En otra realización más el receptor puede tener actividad catalítica o enzimática y ser capaz de convertir la molécula de señalización celular a una forma que ya no se reconoce por el organismo diana o ya no da como resultado conmutación patogénica.

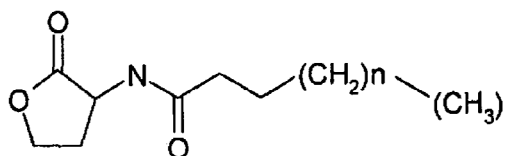
En otra realización más el anticuerpo se usa en una o más de las aplicaciones anteriores en combinación, o en combinación con otras terapias, por ejemplo antibióticos, para proporcionar regímenes terapéuticos aditivos y potenciados, control de la enfermedad y gestión del tratamiento.

10 Los anticuerpos (o equivalentes) de la presente invención podrían administrarse para tratar infección bacteriana o usarse como una medida preventiva para los que estén en alto riesgo de infección. En caso de que ya exista infección, los anticuerpos puedan administrarse solos o en combinación con anticuerpos anti-bacterianos o antibióticos u otros tratamientos anti-microbianos. La administración de anticuerpos anti-HSL junto con otras terapias puede permitir el uso de ciclos más cortos o dosis más bajas de agentes terapéuticos, reduciendo de este modo el riesgo de resistencia que surge y mejorando la conformidad del paciente.

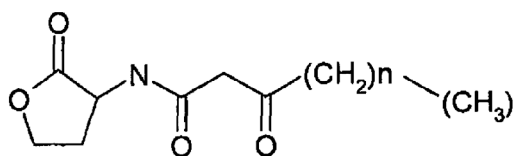
15 De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención se proporciona un anticuerpo de cadena sencilla (scAb) de los clones de *E. coli* G3H5, G3B12, G3G2 o G3H3 depositados como NCIMB-41167, NCIMB-41168, NCIMB-41169 y NCIMB-41170 respectivamente.

20 De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se proporciona el uso de un anticuerpo de cadena sencilla (scAb) de los clones de *E. coli* G3H5, G3B12, G3G2 o G3H3 depositados como NCIMB-41167, NCIMB-41168, NCIMB-41169 y NCIMB-41170 respectivamente en la preparación de un medicamento para el tratamiento de infección bacteriana.

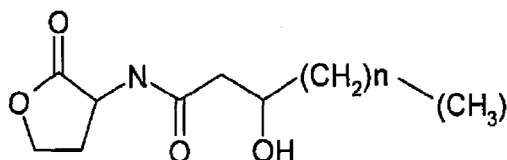
25 Se proporciona un procedimiento para explorar una biblioteca de presentación de fagos humanos vírgenes con respecto a un anticuerpo monoclonal anti-bacteriano específico para una molécula de señalización bacteriana, comprendiendo el procedimiento conjugar una molécula seleccionada del grupo que consiste en una molécula de homoserina lactona de la fórmula general:



Fórmula I

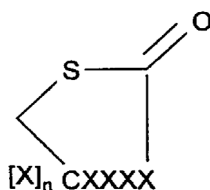


Fórmula II

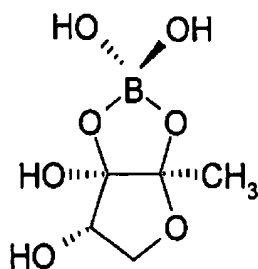


Fórmula III

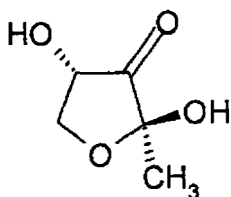
30 en la que  $n = 0$  a  $12$ ,  
una péptido tiolactona de fórmula general (IV):



en la que X es cualquier aminoácido y  $n = 1$  a  $10$ ;  
o Auto Inductor-2 (AI-2)



o Pro-AI-2 o un derivado de ácido carboxílico saturado o insaturado C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> del mismo



- 5 con una molécula vehículo, explorar la biblioteca para generar una biblioteca enriquecida y explorar dicha biblioteca enriquecida frente a la misma molécula de señalización bacteriana conjugada con una segunda molécula vehículo diferente para identificar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la forma soluble libre de la homoserina lactona, péptido tiolactona, AI-2 o Pro-AI-2 o un derivado de ácido carboxílico saturado o insaturado C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> del mismo de la biblioteca de presentación de fagos humanos vírgenes en presencia de derivados conjugados de los mismos.
- 10 Tales procedimientos son por lo tanto un medio para identificar una molécula de unión específica que puede usarse como un agente anti-bacteriano, por ejemplo en el tratamiento de una infección bacteriana. La molécula de unión específica es un anticuerpo o un fragmento del mismo, por ejemplo un anticuerpo monoclonal. Convenientemente la molécula vehículo es una proteína como se ha descrito anteriormente. La población de moléculas de unión específicas es una biblioteca de presentación de fagos.
- 15 Pueden usarse moléculas de unión específicas identificadas por un procedimiento de la presente invención en medicina o un procedimiento de tratamiento como se ha descrito anteriormente. Las moléculas de unión específicas pueden usarse adicionalmente en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección bacteriana.
- 20 Tales procedimientos se extienden por lo tanto a usos de una molécula de señal de lactona bacteriana para explorar una población de moléculas de unión específicas para identificar una molécula de unión específica que se une específicamente a dicha molécula señal de lactona bacteriana.
- 25 También se desvela un procedimiento de tratamiento de una infección bacteriana de un sujeto, comprendiendo el procedimiento aislamiento de una molécula señal de lactona bacteriana en una muestra de dicho sujeto y usar dicha molécula señal de lactona bacteriana para explorar una población de moléculas de unión específicas con respecto a una molécula de específica anti-bacteriana para identificar una molécula de unión específica que se une específicamente a la molécula señal y administrar dicha molécula de unión específica identificada de este modo a un paciente que lo necesite.
- 30 Tales procedimientos permiten la identificación de moléculas de unión específicas dirigidas contra los organismos bacterianos infecciosos cuyas moléculas de señalización se encuentran en la muestra. La muestra puede ser de sangre, saliva, tejido, fluido cerebro-espinal, lágrimas, semen, orina, heces, pus, piel o secreciones mucosas. Las muestras de sangre pueden ser de sangre completa o de sangre fraccionada, por ejemplo, plasma sanguíneo. Las muestras tisulares pueden ser una biopsia de cualquier tejido u órgano infectado o potencialmente infectado. Las muestras también pueden tomarse de heridas o sitios de lesión o infección o infección potencial. También pueden usarse muestras de fluido de los pulmones o los contenidos del estómago o los intestinos.
- 35 Las características preferidas para el segundo y posteriores aspectos de la invención son como para el primer aspecto cambiándose lo que deba cambiarse.
- Otros objetos, características y ventajas de la presente invención, incluyendo pero sin limitación aplicaciones relacionadas en huéspedes vegetales y animales, serán evidentes para los expertos en la materia después de revisar la memoria descriptiva y reivindicaciones de la invención.
- 40 Resultará evidente para los expertos en la materia que las composiciones y procedimientos desvelados en el presente documento pueden tener aplicación a lo largo de una amplia serie de organismos en la inhibición, modulación, tratamiento o diagnóstico de enfermedad o afecciones resultantes de infección. Las composiciones y

procedimientos de la presente invención se describen con referencia a *Pseudomonas aeruginosa*, pero está dentro de la competencia de un experto en la materia aplicar los objetos del presente documento a otras especies.

La invención se describirá ahora adicionalmente por referencia a los ejemplos y figuras detalladas posteriormente.

**Descripción de figuras**

- 5 La Tabla 1 enumera diversos fenotipos bacterianos, con las moléculas de señalización celulares y elementos reguladores del sistema de sensibilidad del quórum que lo regulan, para una serie de organismos.
- La Tabla 2 muestra un sumario de las sensibilidades ( $CI_{50}$ ) de scAb anti-HSL a antígeno libre (dDHL-COOH) y a dos análogos de AHL (tDHL y OHHL) en competición con dDHL-BSA como se determina por ELISA de inhibición competitiva.
- 10 La Tabla 3 muestra una comparación de la cinética de dos scAb anti-AHL que se unen a conjugado de dDHL-BSA inmovilizado como se determina por Resonancia de Plasmón Superficial usando un instrumento BIAcore 2000. Se proporcionan la constantes de asociación ( $k_a$ ), constantes de disociación ( $k_d$ ) y constantes de afinidad ( $K_A$ ,  $K_D$ ).
- 15 La Tabla 4 muestra un sumario de las sensibilidades ( $CI_{50}$ ) de clones anti-HSL derivados de redistribución de cadenas para diversas HSL. Se encuentra entre paréntesis ( ) debajo de cada nuevo clon la designación del clon del que derivó. El grado de sensibilidad aumentada a antígeno de clones nuevos sobre el clon de partida se proporciona entre paréntesis ( ) cuando sea aplicable. Los datos comparan la unión a HSL libres en competición con conjugado de dDHL-TG como se determinó por ELISA de competición.
- 20 La Tabla 5 muestra los efectos de scAb anti-HSL en la reducción de la expresión del factor de virulencia elastasa por *Ps. aeruginosa*. Los datos representan la relación de zona de aclaramiento y área de colonia, expresada como un porcentaje en comparación con el control de PBS (100 %).
- 25 La Figura 1(a) muestra las estructuras químicas de las tres clases representativas de moléculas de señalización de células bacterianas de homoserina lactona. Estas difieren en la sustitución en la posición C3 y varían dentro de cada clase por la longitud de la cadena lateral de acilo (típicamente  $n=0$  a  $n=10$ ). Además, puede haber un enlace cis presente dentro de la cadena de acilo. La Figura 1 (b) muestra las estructuras de i) pro-AI-2, el precursor inmediato de AI-2, ii) la molécula de AI-2 activa que contiene boro y iii) el hapteno pro-AI-2 reactivo usado para preparar conjugados; y la Figura 1(c) muestra ejemplos de moléculas de señalización de péptido tiolactona usadas por i) *Staphylococcus aureus* Grupo I, ii) *S. aureus* Grupo II, iii) *S. aureus* Grupo III y iv) *S. aureus* Grupo IV.
- 30 La Figura 2 ilustra la regulación genética de sensibilidad dependiente de densidad celular o quórum. El mecanismo de señalización celular consiste en dos componentes: 1) los homólogos del gen *l* (*lasI* y *rhII*) sintetizan cantidades crecientes de moléculas de señalización celular bacteriana (HSL) a lo largo del crecimiento (de aquí la sensibilidad de quórum), y 2) la unión dependiente de concentración de moléculas de señalización con un homólogo de proteína R afín (codificado por *lasR* y *rhIR*) que a su vez pueden activar una serie de genes particulares (operón), permitiendo a las bacterias coordinar una acumulación fenotípica dependiente de densidad (por ejemplo virulencia, enjambrazón).
- 35 La Figura 3 ilustra los principios del ensayo de gen indicador bioluminiscente usando plásmido pSB1075. Una reducción de la producción de luz es indicativa del bloqueo exitoso de la señalización de células bacterianas.
- 40 La Figura 4 muestra una comparación de las capacidades de anticuerpos de cadena sencilla irrelevantes y específicos de HSL inmovilizados en una matriz de columna inerte para retirar HSL de la solución por captura de inmuno-afinidad. Los eluatos de columna se aplicaron a un sustituto de *E. coli* de *Vibrio fischeri* (JM107-pSB401) y el efecto de HSL residual en los eluatos se determinó a partir de la estimulación posterior de los cultivos bacterianos para fluorecer como se mide por ULR. ScAb G3B12 y G3G2 son específicos de HSL, anti-VZV es específico de una proteína viral, anti-Paraquat y anti-Atrazina son específicos de herbicidas con pesos moleculares similares a las moléculas de HSL y el control de resina no contenía scAb inmovilizado. Los datos representan la media de tres muestras repetidas de dos ensayos separados. Se indican los errores típicos.
- 45 La Figura 5 muestra los efectos inhibidores de anticuerpos de cadena sencilla específicos e irrelevantes en la estimulación mediada por dDHL de un sustituto de *E. coli* de *Ps. aeruginosa* (JM109-pSB1075) como se mide por producción de bioluminiscencia. Se proporcionan datos para el scAb específico de HSL- G3H5 (●), un scAb de control no específico (▼) (específico de una proteína de superficie bacteriana patogénica) y en ausencia de scAb (○). Los puntos de datos representan la media de tres muestras repetidas de ensayos repetidos.
- 50 La Figura 6 muestra los efectos inhibidores de anticuerpos de cadena sencilla específicos e irrelevantes en la estimulación mediada por tDHL de un sustituto de *E. coli* de *Ps. aeruginosa* (JM109-pSB1075) como se mide por producción de bioluminiscencia. Se proporcionan datos para tres scAb específico de HSL; G3H3 (●), G3G2 (■) y G3B12 (□), para el scAb anti-V irrelevante (○) (específico de una proteína de superficie bacteriana
- 55

patogénica) y en ausencia de scAb (V). Los puntos de datos representan las medias de tres muestras repetidas de ensayos repetidos.

5 La Figura 7 muestra los efectos inhibidores de anticuerpos de cadena sencilla específicos e irrelevantes (no específicos) en la estimulación mediada por BHL de un sustituto de *E. coli* (JM109-pSB406) de sistema *RrhI* de *Ps. aeruginosa* (sensible a HSL de cadena corta) como se mide por producción de bioluminiscencia después de (a) 60 minutos y (b) 150 minutos. Se presentan datos para anticuerpos G3H5, G3B12 y G3H3 un anticuerpo de control no específico (específico para una proteína de superficie bacteriana patogénica) y en ausencia de anticuerpo (solamente tampón PBS). Los puntos de datos representan las medias de tres muestras repetidas de ensayos repetidos.

10 La Figura 8 muestra el ensayo de nematodo de muerte lenta que demuestra la capacidad de los anticuerpos G3H5 y G3B12 para proteger nematodos contra infección por (a) el patógeno bacteriano *Pseudomonas aeruginosa* cepa PA14 y (b) *Ps. Aeruginosa* cepa PA01.

15 La Figura 9 muestra datos de ELISA de competición para unión de scAb anti-péptido YST-1 con control de BSA o conjugado de péptido-BSA en presencia o ausencia de péptido libre "YSTGGAGSGG" o péptido de tiolactona libre Agr-D1 (véase Figura 1c).

### Ejemplo 1

Los ejemplos descritos en el presente documento se refieren a *Vibrio fisheri* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estos se proporcionan solamente como un ejemplo, limitándose el alcance de la invención solamente por las reivindicaciones.

20 Se sintetizó un derivado de una HSL (designado dDHL-COOH), que tenía una cadena de acilo de doce carbonos que actuaba como un "engarce" y que terminaba en un agrupo de ácido carboxílico (véase Figura 1). Este se conjugó, mediante el grupo de ácido carboxílico, con las proteínas vehículo Albúmina de Suero Bovino (BSA) y Hemocianina de Lapa Californiana (KLH) para producir dDHLBSA y dDHL-KLH. Brevemente, se disolvieron 50 mg de BSA o KLH en 1,67 ml de agua y a esto se añadieron 3,3 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM a pH 8,5, todos a 4 °C. A esto, se añadieron 1,05 ml de dimetilformamida seca (DMF) en gotas con agitación. Se disolvieron 10 mg de *N*-hidroxisuccinimida éster activada de dDHL-COOH en 100 µl de DMF seca y se añadieron de nuevo lentamente a la solución de proteína vehículo a 4 °C. La mezcla de reacción se agitó bien y se permitió que reposara durante 24 horas a 4 °C. El material conjugado se dializó después frente a agua 4 X 1 litro, y la conjugación se confirmó por espectroscopia de masas MALDITOF.

30 El término "engarce" se refiere a cualquier grupo químico usado para permitir la unión del hapteno (antígeno) con (preferentemente) una molécula vehículo inmunogénica de modo que el hapteno se presente lejos de la superficie del vehículo.

35 En objetos alternativos de la invención, pueden emplearse otras moléculas vehículo tales como perlas magnéticas o biotina, y otros engarces y estrategias de conjugación. Las dos formas conjugadas de dDHL se usaron después para explorar una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpos. Brevemente, la biblioteca se exploró durante un total de 3 ciclos de bio-selección. En cada ciclo se inmovilizó un conjugado de dDHL en un soporte sólido y se incubó con la biblioteca de anticuerpos de fago durante un tiempo suficiente para que los anticuerpos de fago reconocieran el conjugado al que unirse. Los fagos no unidos se retiraron por lavado riguroso con PBS (Solución Salina Tamponada con Fosfato) y PBS-Tween, y el fago unido restante se eluyó por incubación a pH bajo (ciclo 1). El fago eluido se usó después para infectar bacterias *E. coli* y se amplificó por procedimientos familiares para los expertos en la materia. La biblioteca amplificada resultante de clones enriquecidos se usó después para el siguiente ciclo de selección. Para reducir los números de clones seleccionados que reconocen la proteína vehículo, el conjugado inmovilizado (dDHL-BSA o dDHL-KLH) se alternó con ciclos sucesivos de selección. Para desviar la selección en favor de clones que reconozcan una HSL específica, la HSL seleccionada (dDHL-COOH) se usó para eluir de forma competitiva anticuerpos de fagos durante los ciclos 2 y 3, en lugar de pH bajo. Los clones de fagos individuales del ciclo 3 se exploraron por ELISA: Cada clon se ensayó inicialmente con respecto a la capacidad para unirse a cada uno de los conjugados de dDHL y con las proteínas vehículo anteriores. Los clones capaces de unirse a ambos conjugados pero incapaces de unirse a una de las proteínas vehículo se ensayaron adicionalmente para identificar aquellos cuya unión con el conjugado podría inhibirse por la presencia de dDHL-COOH libre en solución. Los genes de región variable de anticuerpo de los clones de fago que se ha descubierto que se unen a dDHL-COOH libre se subclonaron en un vector de expresión soluble (pIMS 147), y se produjeron como fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla solubles (scAb) que comprenden los dominios de cadena pesada y ligera variables unidos por un engarce peptídico flexible y un dominio constante kappa de un anticuerpo humano. La cuantificación de la unión de scAb soluble con HSL libres se determinó por ELISA de inhibición competitiva. Se incubaron muestras que contenían una concentración constante de cada scAb seleccionado (con respecto a 1 microgramo por ml de dDHL-BSA) con un intervalo de concentraciones de dDHL-COOH libre (o conjugado de dDHL) durante 1 hora, se aplicaron después a una placa de ELISA revestida con dDHL-BSA. Después de una hora de incubación, se retiró por lavado scAb no unido y cualquier scAb restante unido al conjugado inmovilizado se detectó con anticuerpo kappa anti-humano marcado con enzima. La sensibilidad de scAb por dDHL-COOH libre y reactividad cruzada con otras HSL (tDHL y OHHL) se determinó a partir de una concentración de antígeno libre que redujo la unión de scAb (sin



antígeno libre) con dDHL-BSA en 50 % ( $CI_{50}$ ) (Tabla 2).

La cinética de unión para scAb anti-HSL que se unen a dDHL-BSA se determinó usando un BIAcore 2000 (BIAcore, Suecia). Se activó una microplaca CM5 con EDC 0,2 M [1-3-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida-HCl] / NHS (N-hidroxisuccinimida) 0,05 M y dDHL-BSA o BSA solo acoplado a la microplaca en Na-acetato 10 nM a pH 3,5 o 4,5 respectivamente. Se ensayó una serie de 10 concentraciones de scAb (100 a 1.000 nM) por duplicado en tampón de HBS a un caudal de 20 microlitros/minuto. Entre las muestras la microplaca se regeneró con 20 microlitros de NaOH 100 mM. La cinética se determinó usando el paquete de software BIAevaluation 3 (Tabla 3).

La capacidad del scAb G3B12 para unirse a OHHL se evaluó adicionalmente inmovilizando scAb con perlas de níquel-sepharose en una columna mediante un marcador de histidina 6 x y pasando una solución de OHHL a través de la columna. Cualquier OHHL unido por el scAb y retenido en la columna se eluyó posteriormente. Se determinó la concentración de OHHL en el flujo continuo de columna (es decir no unido) y el unido y posteriormente eluido.

La capacidad de los scAb para unirse a HSL y modular la respuesta de bacterias a AHL se determinó usando cepas de *E. coli* JM107 que contenían el plásmido pSB401 (sustituto de respuesta a *Vibrio fischeri*) y JM109 que contenía los plásmidos pSB406 y pSB406 (sustituto de respuesta a *Pseudomonas aeruginosa*). Los plásmidos indicadores contienen los genes reguladores de respuesta a HSL *luxR* (pSB401), *lasR* (pSB1075, sensibles a HSL de cadena larga) o *rhIR* (pSB406, sensible a HSL de cadena corta) y la región promotora de *luxI*, que junto con las HSL exógenas activa la expresión de la fusión génica *luxCDABE* (los genes estructurales de luminiscencia) de *Photobacterium luminescens*. En las condiciones de crecimiento apropiadas estas células se inducen para emitir luz en respuesta a la presencia de HSL extra-celulares, siendo la intensidad de luz emitida proporcional a la concentración de HSL.

Se expresaron scAb solubles de clones seleccionados de la biblioteca usando protocolos publicados (Strachan y col., 1998). Durante la purificación de cromatografía de afinidad de metal inmovilizada (IMAC), no se eluyó scAb de la columna de níquel-sepharose. También se expresó una serie de scAb adicionales con especificidades para antígenos irrelevantes y se inmovilizaron en columnas de níquel-sepharose para actuar como controles. Se aplicaron 500 microlitros de OHHL 10 nM a cada columna y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Las columnas se centrifugaron a 40 g durante 15 s y se recogió el flujo continuo. Cualquier OHHL unido se eluyó con 250 microlitros de NaCl 1 M. El flujo continuo original se volvió a aplicar y se incubó como anteriormente, el flujo continuo se recogió y la HSL unida se eluyó con NaCl 1 M.

Se aplicaron muestras de solución de HSL antes y después del pase a través de la columna de scAb inmovilizado a cultivos de pSB401 en *E. coli* JM107 y la luz emitida se midió con un luminómetro. Se llevaron a cabo experimentos de control apropiados usando una columna en la que no se había inmovilizado scAb y tres columnas adicionales que incluían scAb con especificidad para los antígenos irrelevantes. Las células se cultivaron en agitación a 37 °C durante 18 horas en medio LB que contenía tetraciclina. Se inoculó un mililitro del cultivo en 100 ml de medio de tetraciclina LB y se dejó crecer a 37 °C hasta que se consiguió una DO 600 nm de 0,2. Se aplicaron 100 µl del cultivo a pocillos repetidos de una placa de bioensayo negra de 96 pocillos y se añadió un volumen igual de solución de HSL. Las soluciones de HSL fueron OHHL 10 nM (control positivo), agua milli-Q pasada a través de una columna de níquel-sepharose (control de resina) o el flujo continuo del pase de OHHL 10 nM sobre columnas que contienen scAb inmovilizado como se ha descrito anteriormente. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 horas con agitación y la luminiscencia se leyó usando un luminómetro Anthos LUCY1 durante 1 segundo (Figura 4).

La capacidad de los scAb para reducir respuestas bacterianas a HSL de cadena larga se evaluó con un bioensayo indicador de luminiscencia inducible por HSL durante un periodo de 3,0 horas usando la cepa de *E. coli* JM109-pSB1075. Esta cepa es esencialmente como se ha descrito para JM107-pSB401, siendo la diferencia que el plásmido pSB1075 incluye el *lasR* de *Pseudomonas aeruginosa* en lugar de *luxR* de *Vibrio fischeri*. Se inocularon colonias sencillas de JM109-pSB1075 en 10 ml de caldo de cultivo LB con antibiótico y se incubó durante una noche a 37 °C. Se inocularon doscientos microlitros de cultivo de una noche en 10 ml de medio nuevo y se incubaron a 37 °C con agitación hasta DO 600 nm de 0,2. Se añadió HSL a los cultivos (dDHL-COOH a 20 nM de concentración final o tDHL a 50 nM de concentración final) y se añadieron cien microlitros de cultivo a pocillos por triplicado de una placa de 96 pocillos negra. Se añadió medio LB a controles negativos. Se añadieron 50 microlitros de PBS o 50 microlitros de scAb a 2 mg/ml a cada pocillo y la placa se incubó adicionalmente durante tres horas en agitación a 37 °C, después de dicho tiempo se midió la luminiscencia a intervalos de 30 minutos y se determinó el efecto de scAb en la señalización celular (Figuras 5 y 6). Los datos demuestran la capacidad de anticuerpos anti-HSL para reaccionar de forma cruzada con moléculas de homoserina lactona estructuralmente diferentes y para reducir o eliminar la respuesta de un sustituto de *Ps. aeruginosa* a HSL extra-celular.

La capacidad de los scAb para reducir respuestas bacterianas a HSL de cadena corta se evaluó de una manera similar a la descrita anteriormente. El sistema indicador de bioluminiscencia usó la cepa de *E. coli* JM109 con el plásmido indicador pSB406, que incluía el regulador de elemento de respuesta *rhIR*. La molécula señal BHL (como acil-HSL en la Figura 1 pero con cadena lateral de 4 carbonos) se añadió a los cultivos de *E. coli* a 50 nM de concentración final (un volumen equivalente de medio LB se añadió a cultivos de control negativo) y se añadieron 100 ml de cultivo a pocillos por triplicado de la placa de ensayo. Se añadieron después 50 ml de scAb a 100 nM o 50 µl de PBS y las placas se incubaron como se ha descrito anteriormente. Se tomaron mediciones de luminiscencia

después de 60 minutos y 150 minutos (Figura 7).

### Ejemplo 2

Para evaluar la capacidad de scAb anti-HSL para proporcionar protección a animales contra *Ps. Aeruginosa* patógena, se empleó un ensayo de “muerte lenta” usando el nematodo *C. elegans*. Este ensayo se basa en la muerte de los gusanos después del establecimiento de una infección por *Ps. aeruginosa* en el intestino del animal.

La cepa de *Ps. aeruginosa* PA 14 se infectó en 5 ml de caldo de cultivo LB el día 1 y se incubó durante una noche a 37 °C. El día 2, se inoculó 1 % del cultivo de una noche en 5 ml de LB nuevo con 100 µl de scAb en caldo de cultivo 100 nM y se incubó a 37 °C hasta DO 600 nm de 0,4. Se aplicaron puntualmente 10 µl de cultivo bacteriano en el centro de placas de agar de peptona enriquecida con NG (medio de crecimiento de nematodos), junto con 50 µl de scAb a 120 nM y las placas se incubaron durante una noche a 37 °C. El día 3 (pm) se aplicaron puntualmente 50 µl adicionales de scAb (120 nM) en las placas y la incubación continuó durante una noche. El día 4 (am) las placas se transfirieron a temperatura ambiente (~20 °C) y se añadieron 50 µl de scAb adicionales. El día 5 (am), se añadieron 50 µl de scAb como anteriormente, y se añadieron 20-5 gusanos adultos directamente en el césped bacteriano (tiempo = 0 horas). Se realizaron adiciones complementarias de scAb en tiempo = 26, 50 y 76 horas. Los números de gusanos muertos se determinaron a intervalos durante los siguientes 3 días (Figura 8a). Los gusanos se consideraron muertos cuando no eran móviles y no respondían a toque por un punzón de alambre fino.

Para las placas de control se usaron PBS o un scAb irrelevante (especifico para un antígeno diana no relacionado) o se dejaron crecer los gusanos en cepa de *E. coli* OP50.

También se llevó a cabo un segundo ensayo usando la cepa de *Ps. aeruginosa* PA01 (Darby y col., 1999). Esta cepa se usó principalmente para “muerte parálitica” (producción de toxinas), pero también es adecuada, aunque menos eficaz que PA14, para estudios de infección de muerte lenta como en este ejemplo.

El ensayo se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente con las siguientes modificaciones. Las adiciones de scAb fueron siempre a concentración de 100 nM. El día 3, se aplicaron puntualmente 50 µl de scAb en placas por la mañana y por la tarde. Después de la segunda edición, las placas se transfirieron a temperatura ambiente y se incubaron durante una noche. Los gusanos y scAb se aplicaron el día 4 (tiempo = 0 horas) y solo se realizaron dos adiciones de scAb complementarias a t= 30 y 60 horas (Figura 8b).

### Ejemplo 3

*Ps. aeruginosa* produce varios productos extra-celulares que, después de la colonización, pueden provocar daño tisular extensivo. Uno de estos, elastasa, es esencial para virulencia máxima de *Ps. aeruginosa* durante infección aguda. La producción de elastasa está bajo el control de la cascada de sensibilidad de quórum de lasI/R. La detección de producción de elastasa puede por lo tanto usarse como un indicador de la capacidad de virulencia de la población bacteriana.

Se inocularon cuatro microlitros de cepa de *Ps. aeruginosa* PA14 a 10<sup>5</sup> UFC por ml (DO baja) o 10<sup>8</sup> UFC por ml (DO alta) en placas de agar que contenían elastina 1 %, polvo lab lemco 0,5 %, peptona 1 %, cloruro sódico 0,5 % y agar 1,5 % y se incubó a 37 °C durante 5 días. El crecimiento hasta DO baja se opone a la conmutación patogénica, mientras que el crecimiento hasta DO alta estimula la conmutación patogénica. Se añadieron cincuenta microlitros de scAb (200 nM) a las placas junto con las bacterias y se realizaron aplicaciones adicionales del mismo volumen a intervalos de 24 horas a lo largo del ensayo.

El diámetro de las colonias bacterianas y las zonas claras circundantes (indicativas de lisis de elastina por elastasa) se midió directamente y la actividad elastolítica de las colonias se determinó como una relación del área de zona clara y el área de colonia bacteriana. De nuevo, se realizaron 3-4 repeticiones por ensayo y se usó *E. coli* XL1-Blue como un control negativo (Tabla 5).

### Ejemplo 4

Para aislar anticuerpos anti-HSL con mayor afinidad por antígeno, y para dirigir la especificidad hacia variantes de HSL particulares, se realizó maduración de afinidad en el clon G3B12. Se aisló ADN del fagémido del clon bacteriano G3B12 y el gen de cadena ligera variable se amplificó por PCR usando un cebador oligonucleotídico 5', LINKER-REV que comprende las últimas 30 bases de la región de engarce flexible de 45 pares de bases (5'-GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTAGTGC-3') y un cebador 3' gIII-FOR (5'-GAATTTTCTGTATGAGG-3'), específico del gen de proteína de revestimiento menor del fago gIII. El producto del tamaño correcto (~380 pb) se sometió a electroforesis en un gel de agarosa 1 %, se escindió y se purificó. De manera similar, se preparó el ADN del fagémido que contenía la biblioteca virgen humana completa de la que se aisló el clon original. El repertorio completo de genes de cadena pesada variable se amplificó usando el cebador 5' AH1-REV (5'-AAATACCTATTGCCTACGGC-3') específico de la secuencia líder pelB y el cebador 3' LINKER-FOR que codifica las primeras 30 bases de la región de engarce (5'-AGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACC-3'). El producto del tamaño correcto (~400 pb) se purificó como anteriormente. El repertorio de genes VH se combinó después con el

gen VL monoclonal por PCR de enlace usando las 15 bases complementarias del centro de la región de engarce que era común para ambos productos de PCR primaria. La nueva biblioteca se amplificó por adición de los cebadores AH1-REV y gIII-FOR a la reacción de PCR de enlace después de 4 ciclos, y se realizaron 25 ciclos adicionales. El ADN amplificado se digirió con las enzimas de restricción *NcoI* y *NotI* y se ligó en un vector de fagémido purificado y digerido de forma similar. El ADN ligado y re-purificado se transformó finalmente en células de cepa de *E. coli* TG1 por electroporación y se sembraron en placas de la manera convencional.

Los anticuerpos de fagos se rescataron con fago auxiliar como anteriormente, y se aplicaron a inmunotubos revestidos con conjugado de dDHL-BSA y se permitió que se unieran. Los fagos no unidos se separaron vertiendo y los agentes de unión débiles/no específicos se retiraron por múltiples etapas de lavado con PBST y PBS. Los fagos específicos conjugados se eluyeron después con trietilamina de pH bajo y se neutralizaron. Estos se usaron para infectar células TG1 de fase logarítmica nuevas, se rescataron y se amplificaron de nuevo durante ciclos sucesivos de selección (selecciones). Para las selecciones sucesivas, el conjugado inmovilizado se alternó entre dDHL-BSA y dDHL-TG. Durante el tercer ciclo de selección, el fago unido de la biblioteca redistribuida se eluyó de las selecciones duplicadas con dDHL libre o con BHL (butirilhomoserina lactona).

Después de 3 ciclos de selección, los anticuerpos de fago monoclonales se exploraron con respecto a características de unión deseadas. Los clones de fagos individuales del ciclo 3 se exploraron por ELISA: cada clon se ensayó inicialmente con respecto a la capacidad para unirse a cada uno de los conjugados de dDHL-BSA y KLH y con las proteínas vehículo solas. Los clones capaces de unirse a ambos conjugados pero incapaces de unirse a una de las proteínas vehículo se ensayaron adicionalmente para identificar aquellos cuya unión con el conjugado podría inhibirse por la presencia de dDHL libre o HSL en solución. Los genes de región variable del anticuerpo de los clones de fagos que se ha descubierto que se unen a BHL/dDHL libre se subclonaron en un vector de expresión soluble (pIMS 147) y se produjeron como fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scAb) solubles que comprendían los dominios de cadena pesada y ligera variables unidos por un engarce de péptido flexible y un dominio constante kappa de un anticuerpo humano. La cuantificación de la unión de scAb soluble con HSL libres se determinó por ELISA de inhibición competitiva. Las muestras que contenían una concentración constante de cada scAb seleccionado (con respecto a 1 microgramo por ml de dDHL-TG) se incubaron con una serie de concentraciones de HSL libre durante 1 hora, después se aplicaron a una placa de ELISA revestida con tDHL-TG. Después de 1 hora de incubación, el scAb no unido se retiró por lavado y cualquier scAb restante unido al conjugado inmovilizado se detectó con anticuerpo kappa antihumano marcado con enzima. La sensibilidad de scAb por HSL libre y la reactividad cruzada con otras HSL se determinó a partir de la concentración de antígeno libre que redujo la unión de scAb (sin antígeno libre) con dDHL-TG en 50 % ( $CI_{50}$ ) (Tabla 4).

### Ejemplo 5

Se sintetizaron dos péptidos convencionales, YST-1 (YSTGGAGSGG) y YST-2 YSTASGGASS, junto con una tercera versión, YST-3, con biotilación<sup>^</sup> (^ indica sitio de biotilación) de la penúltima cadena lateral de lisina C-terminal (YSTAGGSGAK<sup>^</sup>S). También se sintetizó un cuarto péptido de tiolactona YSTC\*DFIM\* (Agr-D1), en el que \* indica restos conectados por el anillo de tiolactona (véase Figura 1c). Algo de YST-1 se conjugó con BSA e YST-2 con tiroglobulina bovina (TG) mediante el extremo C terminal usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) por química de conjugación convencional.

Se seleccionó una biblioteca de anticuerpos vírgenes humanos durante cuatro ciclos frente a conjugados YST-1 y YST-2 inmovilizados alternantes esencialmente como se ha descrito previamente. Después de la unión de anticuerpos de fago durante 1 hora, los fagos no unidos se retiraron vertiendo y el fago unido débilmente se retiró por lavado exhaustivo con PBST seguido de PBS. Los fagos unidos se eluyeron con trietilamina y se neutralizaron, después se infectaron en células de *E. coli* TG1 en fase logarítmica. Los fagos enriquecidos se amplificaron rescatando con fago auxiliar, después se purificaron y se concentraron por precipitación de polietilenglicol dejándolos listos para el siguiente ciclo de selección. Después de lavar el fago unido a conjugados de YST-1/2 en los ciclos 3 y 4, los fagos se eluyeron con una solución de YST-3. Los fagos que se unieron al péptido biotilado se capturaron por perlas paramagnéticas revestidas con estreptavidina y se inmovilizaron con un imán. Después de etapas de lavado adicionales, el fago unido se añadió directamente a células TG1 y se permitió que infectara como anteriormente.

Después de cuatro ciclos de selección, se exploraron anticuerpos de fago monoclonales por ELISA con respecto a unión con conjugados de YST-1 y YST-2 y con proteínas vehículo BSA y TG solamente. Los genes de scFv de los clones que se unieron solamente a ambos conjugados se subclonaron en el vector de expresión soluble de scAb pIM-147 y se transformaron en células *E. coli* XL1-Blue. Estas células se expresaron, y los scAb solubles se extrajeron del espacio periplásmico bacteriano y se purificaron por cromatografía de afinidad de níquel. Los scAb purificados se ensayaron adicionalmente después con respecto a unión con péptido libre (no conjugado) y con autoinductor de péptido tiolactona Agr-D1, en competición con conjugados de péptido inmovilizado por ELISA. La reducción de la señal en presencia de péptido en comparación con la unión con conjugado solamente indica que scAb reconoce el epítipo de YST común de todos los péptidos (Figura 9).

**Ejemplo 6**

Para generar anticuerpos contra la diana Al-2, se requieren tanto la molécula de Al-2 libre como una forma conjugada. (Se considera que) no es posible aislar Al-2 en una forma pura. En la naturaleza, Al-2 se forma por la reacción (espontánea) de pro-Al-2 (Figura 1(b)) con ácido bórico. *In vitro*, pro-Al-2 también reaccionará con ácido bórico para producir Al-2 activo, sin embargo esto no es adecuado para conjugación y selección de anticuerpos. Un derivado de pro-Al-2 puede sintetizarse por lo que el grupo metilo se reemplaza por un engarce, por ejemplo, una cadena de acilo, con un grupo reactivo terminal, por ejemplo, ácido carboxílico. Cualquier estructura que incluya un grupo reactivo terminal adecuado para conjugación química o reticulación con un vehículo, y que de cómo resultado que el resto central de pro Al-2 se presente separado de la superficie del vehículo, puede usarse como un engarce. El pro-Al-2 reactivo se conjuga preferentemente con dos vehículos diferentes como se describe en la sección "sumario de la invención".

Se aplica una biblioteca de receptores potenciales (por ejemplo, una biblioteca de anticuerpos presentada en fagos) a un conjugado inmovilizado en presencia de ácido bórico (preferentemente > 10  $\mu$ M, pH 6,0-8,0) para producir conjugado de Al-2 inmovilizado. Se permite que los anticuerpos de fagos ("fago") se unan, y los que no reconozcan el conjugado se retiran por lavado. El fago unido puede eluirse con pH alto o bajo, por ejemplo, trietilamina, o por unión competitiva con Al-2 libre o por unión competitiva con, por ejemplo, Al-2 biotinilado seguido de retirada con perlas de estreptavidina magnéticas. Durante todas las etapas de bioselección excepto elución a pH extremo, debería estar presente borato para asegurar que se mantenga la estructura correcta de Al-2. El fago eluido debería volver a usarse para infectar bacterias huésped (*E. coli*), amplificarse por células en crecimiento en condiciones de producción de partículas de fago y purificarse para el siguiente ciclo. Se llevan a cabo ciclos posteriores de selección como se ha descrito para el ciclo uno excepto que, preferentemente, el conjugado inmovilizado se alterna.

Cuando se han completado suficientes ciclos de selección, pueden ensayarse clones individuales (monoclonales) con respecto a agentes de unión a Al-2. Es probable que se necesiten al menos tres ciclos de selección, aunque pueden aislarse clones de unión a Al-2 después de solamente un ciclo, o puede ser necesario realizar más de tres ciclos. Puede realizarse ELISA de fago policlonal después de cada ciclo por procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia para determinar cuántos ciclos se requieren. Deberían producirse anticuerpos de fago monoclonales como se ha descrito en ejemplos anteriores, y ensayarse con respecto a unión con cada uno de los conjugados usados para selección y con los vehículos no conjugados respectivos. Puede usarse un tercero o cuarto conjugado o conjugados adicionalmente si están disponibles. Se identificarán clones positivos potenciales como los que se unen a todos los conjugados disponibles en presencia de borato, pero no a moléculas vehículo solamente y preferentemente no a conjugado en ausencia de borato.

Puesto que es posible que la reacción de pro-Al-2 con borato pueda producir más de una especie, será preferible demostrar que los anticuerpos reconocen en particular la estructura de Al-2 correcta. Esto podría determinarse ensayando con respecto a unión con conjugado en presencia de pro-Al-2 libre y borato. Una reducción de la unión con concentraciones crecientes de pro-Al-2 libre es indicativa de inhibición competitiva. Se esperaría por lo tanto que tales anticuerpos fueran capaces de modular la respuesta de bacterias sensibles a Al-2 uniéndose a Al-2 extracelular y haciéndolo no disponible a células.

Puede encontrarse un modelo *in vivo* adecuado en *Vibrio harveyi* bioluminiscente, una bacteria que emite bioluminiscencia en respuesta a Al-2. Las cepas de *V. harveyi* que son LuxS<sup>-</sup> son incapaces de sintetizar DPD (un precursor de pro-Al-2) y por lo tanto no pueden producir Al-2. Estas son, sin embargo, capaces de responder (por producción de luz aumentada) en respuesta a Al-2 añadido de forma exógena, en forma de pro Al-2 junto con borato, o como un medio de cultivo sin células que contiene borato obtenido de *V. harveyi* LuxS<sup>+</sup>. La adición de borato solo a células LuxS<sup>-</sup> o a células LuxP<sup>-</sup> (sin el receptor de Al-2 natural) no da como resultado ninguna emisión de luz. Podrían por lo tanto identificarse anticuerpos anti-Al-2 potenciales ("receptores") como los que cumplen los criterios de unión perfilados anteriormente, y que también son capaces de reducir el número de Al-2 de medio de cultivo de *V. harveyi* w.t. como se determina por emisión de luz reducida cuando se añade a células LuxS<sup>-</sup> o de interrumpir/evitar/reducir la emisión de luz cuando se añade a células LuxS<sup>+</sup>.

**Referencias citadas****Documentos de patentes de Estados Unidos**

6.309.651    Octubre de 2001    Frank y col.

**Otros documentos de patente**

WO 01/26650    Abril de 2001    Universidad de Nottingham

WO 01/74801    Octubre de 2001    Universidad de Nottingham

WO 92/01047    Octubre de 2001    Bonnert y col.

**Otras referencias**

- 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 y, Ohman 1995 *J. Bacteriol.* 177 (24): 7155-7163  
 5 Reimann y col., 1997 *Mol. Microbiol.* 24 (2): 309-319  
 Winzer y col., 2000 *J. Bacteriol.* 182 (22): 6401-6411  
 Gambello y 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  
 10 Pearson y col., 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 (1): 197-201  
 Winson y col., 1995 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 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  
 15 Ochsner y col., 1994 *J. Bacteriol.* 176, 2044-2054  
 Pearson y col., 1995 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (5) 1490-1494  
 Latifi y col., 1996 *Mol. Microbiol* 21 (6): 1137-1146  
 Winzer y col., 2000 *J. Bacteriol.* 182 (22): 6401-6411  
 Manefield y col., 1999 *Microbiol. UK* 145: 283-291  
 20 Tepletski y col., 2000 *Mol. Plant Microbe. Interact.*, 13, 637-648  
 Tan y col., 1999a *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 715-720  
 Tan y col., 1999b *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2408-2413  
 Tan y Ausubel, 2000 *Current Opinion in Microbiology* 3: 29-34  
 Darby y col., 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 15202-15207  
 25 Kurz y Ewbank, 2000 *Trends Microbiol. Mar*; 8(3):142-144.  
 Mahajan-Miklos y col., 1999 *Cell* 96: 47-56  
 Jones, M.B. y Blaser, M.J. 2003 *Infection and Immunity* 71(7): 3914-3919  
 Kohler y Milstein, 1975 *Nature* 256: 495-497  
 Roitt y col., 1989 *Immunology* 2<sup>a</sup> Edición, Churchill Livingstone, Londres  
 30 Dougall y col., 1994 *TibTech* 12: 372-379  
 McCafferty y col., 1990 *Nature* 348: 552-554  
 Huston y col., 1993 *Int. Rev. Immunol.*, 10: 195-217  
 Mayville y col., 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1218-1223  
 Hart y col., 2000 *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 460-465  
 35 Whitcombe y col., 1995 *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 7105-7111  
 Ramstrom y col., 1996 *Chem. & Biol.*, 3, 471-477  
 Rachkov y col., 2000 *Anal. Chim. Acta.* 405, 23-29  
 Strachan y col., 1998 *Biosens. Bioelectron.* 13: 665-673

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario P35262WO/NCB	Solicitud internacional N°
---	----------------------------

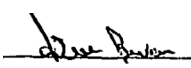
**INDICACIONES RELATIVAS AL DEPÓSITO DE UN MICROORGANISMO**

(Regla 13 bis del PCT)

A. Los datos indicados más abajo se refieren al microorganismo mencionado en la descripción página _____ 17 _____, línea _____ 16 _____	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO	Se identifican otros depósitos en una hoja adicional <input checked="" type="checkbox"/>
Nombre de la institución de depósito NCIMB Ltd	
Dirección de la institución de depósito (incluidos distrito postal y país) 23 St Machar Drive Aberdeen AB 3RY Escocia	
Fecha de depósito: 18 de marzo de 2003	n° de acceso NCIMB 41167
C. INDICACIONES ADICIONALES (sólo en caso necesario) Esta información continúa en una hoja adicional <input type="checkbox"/>	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los Estados designados)  Con respecto a todos los Estados designados para los que sea posible dicha acción y en la medida en que la legislación lo permita según la ley del Estado designado, se requiere que se ponga a disposición una muestra del material biológico depositado solamente por la entrega del mismo a un experto independiente, de acuerdo con la legislación de patentes relevante, por ejemplo Regla 28(4) del EPC, Reglas de Patente de Reino Unido 1995, Programa 2, Párrafo 3, Regulación Australiana 3.25(3) y cláusulas generalmente similares cambiando lo que deba cambiarse para cualquier otro Estado designado.	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (Sólo en caso necesario)  Las indicaciones enumeradas a continuación se suministrarán con posterioridad a la Oficina Internacional (especificar la naturaleza de las indicaciones, por ejemplo "n° de acceso del depósito")	

Reservado a la Oficina receptora

Reservado a la Oficina internacional

<input checked="" type="checkbox"/> Esta hoja se recibió junto con la solicitud internacional

Funcionario autorizado

<input type="checkbox"/> Esta hoja se recibió en la oficina internacional el:
Funcionario autorizado

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

Haptogen Ltd Polworth Building Foresterhill Aberdeen AB25 2ZD	<b>FORMULARIO INTERNACIONAL</b>  <b>RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL</b>  Expedido según la Regla 7.1 por la  <b>AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>  identificada en la parte inferior de esta página
NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE	
<b>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
Referencia de identificación dada por el  DEPOSITANTE:  <i>Escherichia coli</i>  XL1 – Blue G3H5	Número de acceso dado por la  AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:  NCIMB 41167
<b>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</b>	
El microorganismo identificado en el apartado I anterior de acompaña de:  <input type="checkbox"/> una descripción científica  <input checked="" type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta  (Marcar con una cruz lo que sea aplicable)	
<b>III. RECIBO Y ACEPTACIÓN</b>	
Esta Autoridad Internacional de Depósito acepta el microorganismo identificado en el apartado I anterior, que fue recibido por ella el 18 de marzo de 2003 (fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
<b>IV. RECIBO DE PETICIÓN DE CONVERSIÓN</b>	
El microorganismo identificado en el apartado I anterior fue recibido por esta Autoridad Internacional de Depósito el _____ (fecha del depósito original) y fue recibida por ella una petición para convertir el depósito original a un depósito bajo el Tratado de Budapest el _____ (fecha de recibo de la petición de conversión)	
<b>V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>	
Nombre: NCIMB Ltd.,  Dirección: 23 St Machar Drive,  Aberdeen,  AB24 3RY  Escocia.	Firma(s) de la(s) persona(s) competente(s) para representar a la Autoridad Internacional de Depósito o de oficial(es) autorizado(s):  (Firma)   Fecha: 27 de marzo de 2003

<sup>1</sup> Cuando se aplique la Regla 6/4(d), dicha fecha es la fecha en la que se adquirió la categoría de Autoridad Internacional de Depósito.

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario P35262WO/NCB	Solicitud internacional N°
---	----------------------------

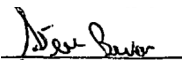
**INDICACIONES RELATIVAS AL DEPÓSITO DE UN MICROORGANISMO**

(Regla 13 bis del PCT)

A. Los datos indicados más abajo se refieren al microorganismo mencionado en la descripción página _____ 17 _____, línea _____ 16 y línea 17 _____	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO	Se identifican otros depósitos en una hoja adicional <input checked="" type="checkbox"/>
Nombre de la institución de depósito NCIMB Ltd	
Dirección de la institución de depósito (incluidos distrito postal y país) 23 St Machar Drive Aberdeen AB 3RY Escocia	
Fecha de depósito: 18 de marzo de 2003	n° de acceso NCIMB 41168
C. INDICACIONES ADICIONALES (sólo en caso necesario)	Esta información continúa en una hoja adicional <input type="checkbox"/>
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los Estados designados)  Con respecto a todos los Estados designados para los que sea posible dicha acción y en la medida en que la legislación lo permita según la ley del Estado designado, se requiere que se ponga a disposición una muestra del material biológico depositado solamente por la entrega del mismo a un experto independiente, de acuerdo con la legislación de patentes relevante, por ejemplo Regla 28(4) del EPC, Reglas de Patente de Reino Unido 1995, Programa 2, Párrafo 3, Regulación Australiana 3.25(3) y cláusulas generalmente similares cambiando lo que deba cambiarse para cualquier otro Estado designado.	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (Sólo en caso necesario)  Las indicaciones enumeradas a continuación se suministrarán con posterioridad a la Oficina Internacional (especificar la naturaleza de las indicaciones, por ejemplo "n° de acceso del depósito")	

Reservado a la Oficina receptora

Reservado a la Oficina internacional

<input checked="" type="checkbox"/> Esta hoja se recibió junto con la solicitud internacional

Funcionario autorizado

<input type="checkbox"/> Esta hoja se recibió en la oficina internacional el:
Funcionario autorizado



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

Haptogen Ltd Polworth Building Foresterhill Aberdeen AB25 2ZD	<b>FORMULARIO INTERNACIONAL</b>  <b>RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL</b>  Expedido según la Regla 7.1 por la  <b>AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>  identificada en la parte inferior de esta página
---	---

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE

<b>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
Referencia de identificación dada por el  DEPOSITANTE:  <i>Escherichia coli</i>  G3B12	Número de acceso dado por la  AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:  NCIMB 41168
<b>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</b>	
El microorganismo identificado en el apartado I anterior de acompaña de:  <input type="checkbox"/> una descripción científica  <input checked="" type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta  (Marcar con una cruz lo que sea aplicable)	
<b>III. RECIBO Y ACEPTACIÓN</b>	
Esta Autoridad Internacional de Depósito acepta el microorganismo identificado en el apartado I anterior, que fue recibido por ella el 18 de marzo de 2003 (fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
<b>IV. RECIBO DE PETICIÓN DE CONVERSIÓN</b>	
El microorganismo identificado en el apartado I anterior fue recibido por esta Autoridad Internacional de Depósito el _____ (fecha del depósito original) y fue recibida por ella una petición para convertir el depósito original a un depósito bajo el Tratado de Budapest el _____ (fecha de recibo de la petición de conversión)	
<b>V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>	
Nombre: NCIMB Ltd.,  Dirección: 23 St Machar Drive,  Aberdeen,  AB24 3RY  Escocia.	Firma(s) de la(s) persona(s) competente(s) para representar a la Autoridad Internacional de Depósito o de oficial(es) autorizado(s):  (Firma)   Fecha: 27 de marzo de 2003

<sup>1</sup> Cuando se aplique la Regla 6/4(d), dicha fecha es la fecha en la que se adquirió la categoría de Autoridad Internacional de Depósito.

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario P35262WO/NCB	Solicitud internacional N°
---	----------------------------

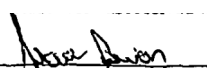
**INDICACIONES RELATIVAS AL DEPÓSITO DE UN MICROORGANISMO**

(Regla 13 bis del PCT)

A. Los datos indicados más abajo se refieren al microorganismo mencionado en la descripción página _____ 17 _____, línea _____ 17 _____	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO	Se identifican otros depósitos en una hoja adicional <input checked="" type="checkbox"/>
Nombre de la institución de depósito NCIMB Ltd	
Dirección de la institución de depósito (incluidos distrito postal y país) 23 St Machar Drive Aberdeen AB 3RY Escocia	
Fecha de depósito: 18 de marzo de 2003	n° de acceso NCIMB 41169
C. INDICACIONES ADICIONALES (sólo en caso necesario) Esta información continúa en una hoja adicional <input type="checkbox"/>	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los Estados designados)  Con respecto a todos los Estados designados para los que sea posible dicha acción y en la medida en que la legislación lo permita según la ley del Estado designado, se requiere que se ponga a disposición una muestra del material biológico depositado solamente por la entrega del mismo a un experto independiente, de acuerdo con la legislación de patentes relevante, por ejemplo Regla 28(4) del EPC, Reglas de Patente de Reino Unido 1995, Programa 2, Párrafo 3, Regulación Australiana 3.25(3) y cláusulas generalmente similares cambiando lo que deba cambiarse para cualquier otro Estado designado.	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (Sólo en caso necesario)  Las indicaciones enumeradas a continuación se suministrarán con posterioridad a la Oficina Internacional (especificar la naturaleza de las indicaciones, por ejemplo "n° de acceso del depósito")	

Reservado a la Oficina receptora

Reservado a la Oficina internacional

<input checked="" type="checkbox"/> Esta hoja se recibió junto con la solicitud internacional

Funcionario autorizado

<input type="checkbox"/> Esta hoja se recibió en la oficina internacional el:
Funcionario autorizado

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

Haptogen Ltd Polworth Building Foresterhill Aberdeen AB25 2ZD	<b>FORMULARIO INTERNACIONAL</b>  <b>RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL</b>  Expedido según la Regla 7.1 por la  <b>AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>  identificada en la parte inferior de esta página
---	---

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE

<b>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
Referencia de identificación dada por el  DEPOSITANTE:  <i>Escherichia coli</i>  G3G2	Número de acceso dado por la  AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:  NCIMB 41169
<b>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</b>	
El microorganismo identificado en el apartado I anterior de acompaña de:  <input type="checkbox"/> una descripción científica  <input checked="" type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta  (Marcar con una cruz lo que sea aplicable)	
<b>III. RECIBO Y ACEPTACIÓN</b>	
Esta Autoridad Internacional de Depósito acepta el microorganismo identificado en el apartado I anterior, que fue recibido por ella el 18 de marzo de 2003 (fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
<b>IV. RECIBO DE PETICIÓN DE CONVERSIÓN</b>	
El microorganismo identificado en el apartado I anterior fue recibido por esta Autoridad Internacional de Depósito el _____ (fecha del depósito original) y fue recibida por ella una petición para convertir el depósito original a un depósito bajo el Tratado de Budapest el _____ (fecha de recibo de la petición de conversión)	
<b>V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>	
Nombre: NCIMB Ltd.,  Dirección: 23 St Machar Drive,  Aberdeen,  AB24 3RY  Escocia.	Firma(s) de la(s) persona(s) competente(s) para representar a la Autoridad Internacional de Depósito o de oficial(es) autorizado(s):  (Firma)   Fecha: 27 de marzo de 2003

<sup>1</sup> Cuando se aplique la Regla 6/4(d), dicha fecha es la fecha en la que se adquirió la categoría de Autoridad Internacional de Depósito.

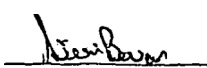
Referencia del expediente del solicitante o del mandatario P35262WO/NCB	Solicitud internacional N°
---	----------------------------

**INDICACIONES RELATIVAS AL DEPÓSITO DE UN MICROORGANISMO**

(Regla 13 bis del PCT)

A. Los datos indicados más abajo se refieren al microorganismo mencionado en la descripción página <u>17</u> , línea <u>17</u>	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO	Se identifican otros depósitos en una hoja adicional <input type="checkbox"/>
Nombre de la institución de depósito NCIMB Ltd	
Dirección de la institución de depósito (incluidos distrito postal y país) 23 St Machar Drive Aberdeen AB 3RY Escocia	
Fecha de depósito: 18 de marzo de 2003	n° de acceso NCIMB 41170
C. INDICACIONES ADICIONALES (sólo en caso necesario)	Esta información continúa en una hoja adicional <input type="checkbox"/>
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los Estados designados)  Con respecto a todos los Estados designados para los que sea posible dicha acción y en la medida en que la legislación lo permita según la ley del Estado designado, se requiere que se ponga a disposición una muestra del material biológico depositado solamente por la entrega del mismo a un experto independiente, de acuerdo con la legislación de patentes relevante, por ejemplo Regla 28(4) del EPC, Reglas de Patente de Reino Unido 1995, Programa 2, Párrafo 3, Regulación Australiana 3.25(3) y cláusulas generalmente similares cambiando lo que deba cambiarse para cualquier otro Estado designado.	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (Sólo en caso necesario)  Las indicaciones enumeradas a continuación se suministrarán con posterioridad a la Oficina Internacional (especificar la naturaleza de las indicaciones, por ejemplo "n° de acceso del depósito")	

Reservado a la Oficina receptora

<input checked="" type="checkbox"/> Esta hoja se recibió junto con la solicitud internacional

Funcionario autorizado

Reservado a la Oficina internacional

<input type="checkbox"/> Esta hoja se recibió en la oficina internacional el:
Funcionario autorizado

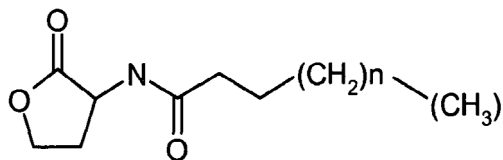
**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPOSITO DE  
MICROORGANISMOS PARA FINES DE PATENTES**

Haptogen Ltd Polworth Building Foresterhill Aberdeen AB25 2ZD	<b>FORMULARIO INTERNACIONAL</b>  <b>RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL</b>  Expedido según la Regla 7.1 por la  <b>AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>  identificada en la parte inferior de esta página
NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL DEPOSITANTE	
<b>I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO</b>	
Referencia de identificación dada por el  DEPOSITANTE:  <i>Escherichia coli</i>  G3H3	Número de acceso dado por la  AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:  NCIMB 41170
<b>II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA</b>	
El microorganismo identificado en el apartado I anterior de acompaña de:  <input type="checkbox"/> una descripción científica  <input checked="" type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta  (Marcar con una cruz lo que sea aplicable)	
<b>III. RECIBO Y ACEPTACIÓN</b>	
Esta Autoridad Internacional de Depósito acepta el microorganismo identificado en el apartado I anterior, que fue recibido por ella el 18 de marzo de 2003 (fecha del depósito original) <sup>1</sup>	
<b>IV. RECIBO DE PETICIÓN DE CONVERSIÓN</b>	
El microorganismo identificado en el apartado I anterior fue recibido por esta Autoridad Internacional de Depósito el _____ (fecha del depósito original) y fue recibida por ella una petición para convertir el depósito original a un depósito bajo el Tratado de Budapest el _____ (fecha de recibo de la petición de conversión)	
<b>V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>	
Nombre: NCIMB Ltd.,  Dirección: 23 St Machar Drive,  Aberdeen,  AB24 3RY  Escocia.	Firma(s) de la(s) persona(s) competente(s) para representar a la Autoridad Internacional de Depósito o de oficial(es) autorizado(s):  (Firma)   Fecha: 27 de marzo de 2003

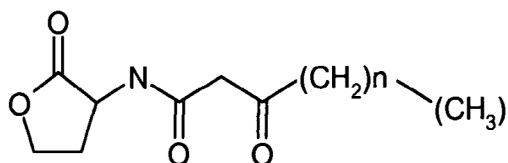
<sup>1</sup> Cuando se aplique la Regla 6/4(d), dicha fecha es la fecha en la que se adquirió la categoría de Autoridad Internacional de Depósito.

REIVINDICACIONES

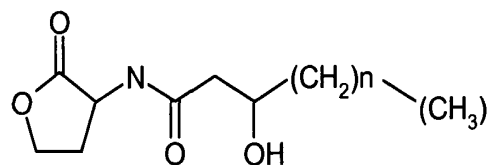
1. Un procedimiento para explorar una biblioteca de presentación de fagos humanos vírgenes con respecto a un anticuerpo monoclonal antibacteriano específico para una molécula de señalización bacteriana, comprendiendo el procedimiento conjugar una molécula seleccionada del grupo que consiste en una molécula de homoserina lactona de fórmula general:



Fórmula I

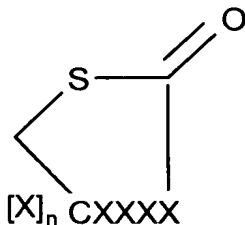


Fórmula II

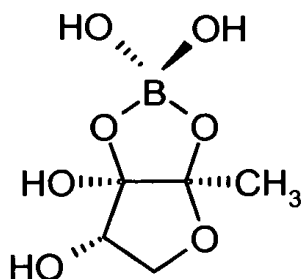


Fórmula III

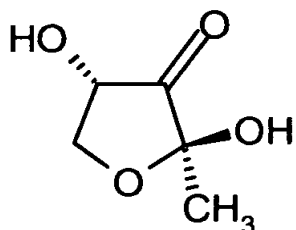
- 10 en la que  $n = 0$  a  $12$ ,  
una péptido tiolactona de fórmula general (IV):



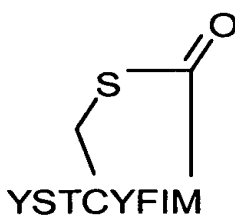
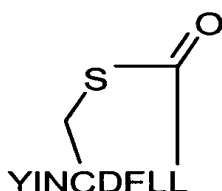
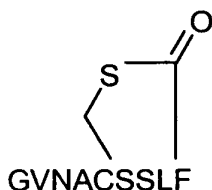
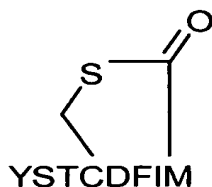
- en la que  $x$  es cualquier aminoácido y  $n = 1$  a  $10$ ;  
o Auto Inductor-2 (AI-2),



- 15 o Pro-AI-2 o un derivado de ácido carboxílico insaturado o saturado  $C_1$ - $C_{10}$  del mismo



- 5 con una molécula vehículo, explorar la biblioteca para generar una biblioteca enriquecida y explorar dicha biblioteca enriquecida frente a la misma molécula de señalización bacteriana conjugada con una segunda molécula vehículo diferente para identificar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la forma soluble libre de la homoserina lactona, péptido tiolactona, AI-2 o Pro-AI-2 o un derivado de ácido carboxílico insaturado o saturado C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> del mismo de la biblioteca de presentación de fagos humanos vírgenes en presencia de derivados conjugados de los mismos.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la molécula vehículo es una proteína.
- 10 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que la molécula 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 de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la molécula de homoserina lactona de fórmula general II es *N*-(-3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (OHHL) en la que n = 2 y *N*-(-3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (OdDHL) en la que n = 8.
- 15 5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la molécula de homoserina lactona de fórmula general III es *N*-(-3-hidroxi-butanoil)-L-homoserina lactona (HBHL) en la que n = 0.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la molécula de péptido tiolactona es:



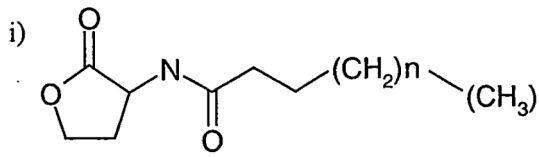
- 20 7. Un anticuerpo de cadena sencilla (scAb) de los clones de *E. coli* G3H5, G3B12, G3G2 o G3H3 depositados como NCIMB-41167, NCIMB-41168, NCIMB-41169 y NCIMB-41170 respectivamente.
8. Un anticuerpo de cadena sencilla de la reivindicación 7 para su uso en medicina.
9. El uso de un anticuerpo de cadena sencilla de la reivindicación 7 en la preparación de un medicamento para el
- 25 tratamiento de infección bacteriana.
10. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de cadena sencilla (scAb) de los clones de *E. coli* G3H5, G3B12, G3G2 o G3H3 depositados como NCIMB-41167, NCIMB-41168, NCIMB-41169 y NCIMB-41170 respectivamente

Tabla 1

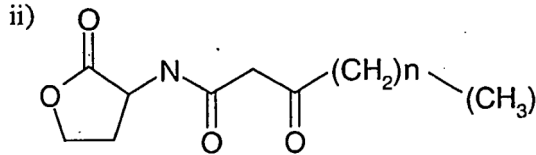
Organismo	Proteínas reguladoras	Molécula señal	Fenotipo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Ahyl/AhyR	BHL, HHL	serina proteasa, metaloproteasa
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Asal/AsaR	BHL, HHL	?
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tral/TraR	HHL, OOHL	conjugación
<i>Burkholderia cepacia</i>	CepI/CepR	OHL	ornibactina, sideróforos, exoproteasa
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Cvii/CviR	HHL	antibióticos, violaceina, exoenzimas, cianuro
<i>Erwinia carotovora</i>	Carl/CarR Expl/ExpR	OHHL +?	antibiótico carbapenem exoenzimas
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Expl/ExpR	OHHL, HHL	pectato liasa
<i>Escherichia coli</i>	?/SdiR LuxS/?	? AI-2	división celular ?
<i>Pantoea stewartii</i>	Esal/Esar	OHHL	Exopolisacárido
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasI/LasR  RhII/RhIR	OdDHL, OHHL, OOHL  BHL, HHL	Factores de virulencia incluyendo: proteasa alcalina, exotoxina elastasa A Quitinasa, piocianina, ramnolípido
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	PhzI/PhzR	BHL, HHL	Antibiótico de fenazina
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PhzI/PhzR	OHL, HHHL, HOHL, HDHL	Antibiótico de fenazina
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Soll/SolR	HHL, OHL	? (aidA)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	RhII/RhIR	HHL, OHL	Nodulación
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	CerI/CerR	?	Expresión de EPS de escape de la comunidad
<i>Serratia liquifaciens</i>	SwrI/?	BHL, HHL	Enjambrazón, fosfolipasa
<i>Vibrio anguillarum</i>	VanI/VanR	ODHL	?
<i>Vibrio fischeri</i>	LuxI/LuxR AinS/AinR	OHHL, HHL OHL	Bioluminiscencia
<i>Vibrio harveyi</i>	LuxI/LuxR LuxPQ/LuxS	HBHL AI-2	Bioluminiscencia
<i>Xenorhombus nematophilus</i>	?	HBHL	Factores de virulencia
<i>Yersinia enterocolitica</i>	YenI.YenR	HHL, OHHL	?
<i>Yersinia pestis</i>	Ypel/YeR	HHL, OHHL	Patogenicidad
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	YpsI/YpsR YtbI/YtbR	HHL, OHHL OHL	Producción de flagelos ?
<i>Bacillus anthracis</i>	?	AI-2	Factores de virulencia



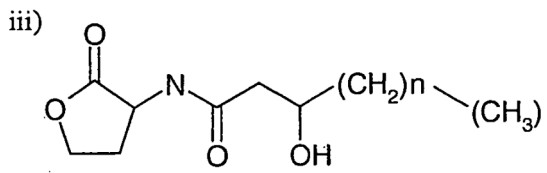
Figura 1a.



Acil-homoserina lactona, por ejemplo, BHL (n=0), dDHL (n=8), tDHL (n=10)



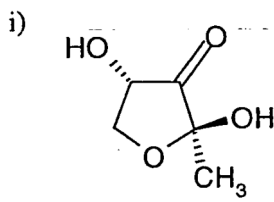
3-oxo-homoserina lactona, por ejemplo, OHHL (n=2), OdDHL (n=8)



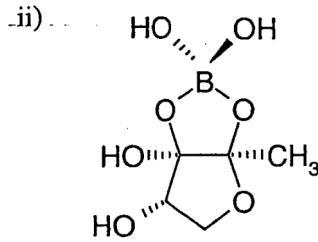
3-hidroxi-homoserina lactona, por ejemplo, HBHL (n=0)

Figura 1b.

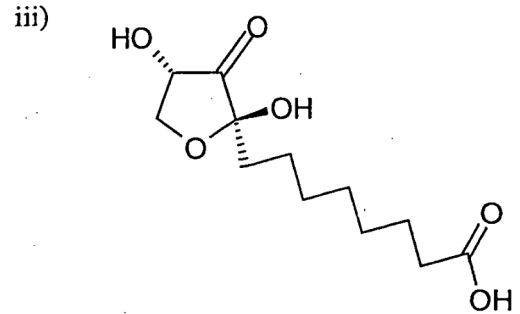
5



Pro AI-2



Auto Inductor-2 (AI-2)



Hapteno sensible a Pro-AI-2

Figura 1c.

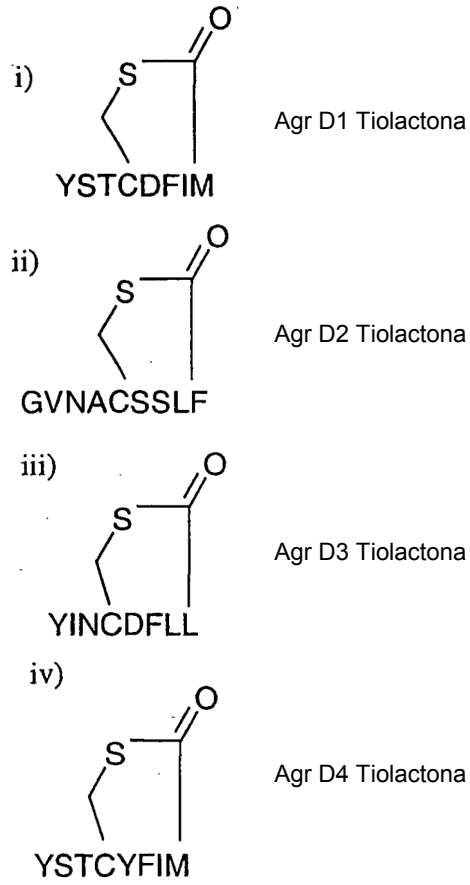


Tabla 2.

scAb	dDHL-COOH	tDHL	OHHL	dDHL-BSA	Paraquat
G3G2	11 $\mu\text{M}$	21 $\mu\text{M}$	17 mM	0,28 $\mu\text{M}$	N/D
G3B12	4 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	2 mM	0,32 $\mu\text{M}$	N/D

N/D indica que no pudo determinarse valor de  $\text{CI}_{50}$ .

5

Tabla 3.

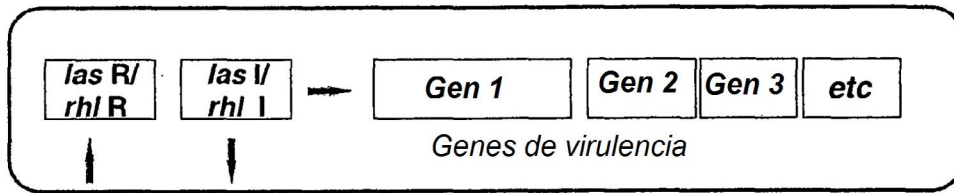
scAb	$k_a$ ( $\text{mol l}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_d$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_A$ ( $\text{mol/l}$ )	$K_D$ (nM)
G3G2	$4,19 \times 10^4$	$1,43 \times 10^{-3}$	$2,93 \times 10^7$	34,1
G3B12	$3,93 \times 10^4$	$1,56 \times 10^{-3}$	$2,52 \times 10^7$	39,7

10

Tabla 4.

scAb	BHL	dDHL	tDHL	OHHL	Paraquat
G3B12	17 mM	1,4 mM	4,5 mM	10 mM	N/D
L1-A7 (G3B12)	1,25 mM (x 13,6)	40 $\mu\text{M}$ (x 35)	-	-	N/D
L1-B7 (G3B12)	-	130 $\mu\text{M}$ (x 10,8)	-	-	N/D
L1-C11 (G3B12)	-	200 $\mu\text{M}$ (x 7)	-	-	N/D
G12 (G3B12)	3 mM (x 5,7)	-	0,6 mM (x 7,5)	5 mM (x 2)	N/D

Figura 2.



**regulación**

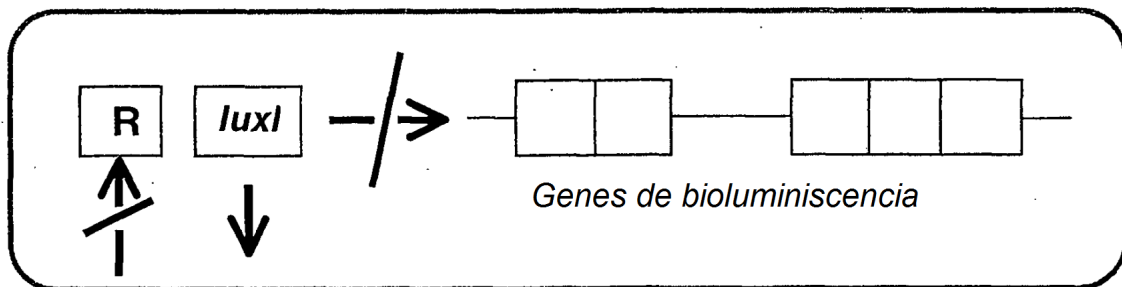
**las I / rhl I**

Produce HSL de cadena larga (*las I*) y cadena corta (*rhl I*)

**las R / rhl R**

Responde a HSL de cadena larga (*las R*) y cadena corta (*rhl R*)

5 Figura 3.



Los anticuerpos anti-HSL detiene la expresión génica evitando que HSL se una a los receptores

**R**

*P. aeruginosa (lasR)*



Figura 4.

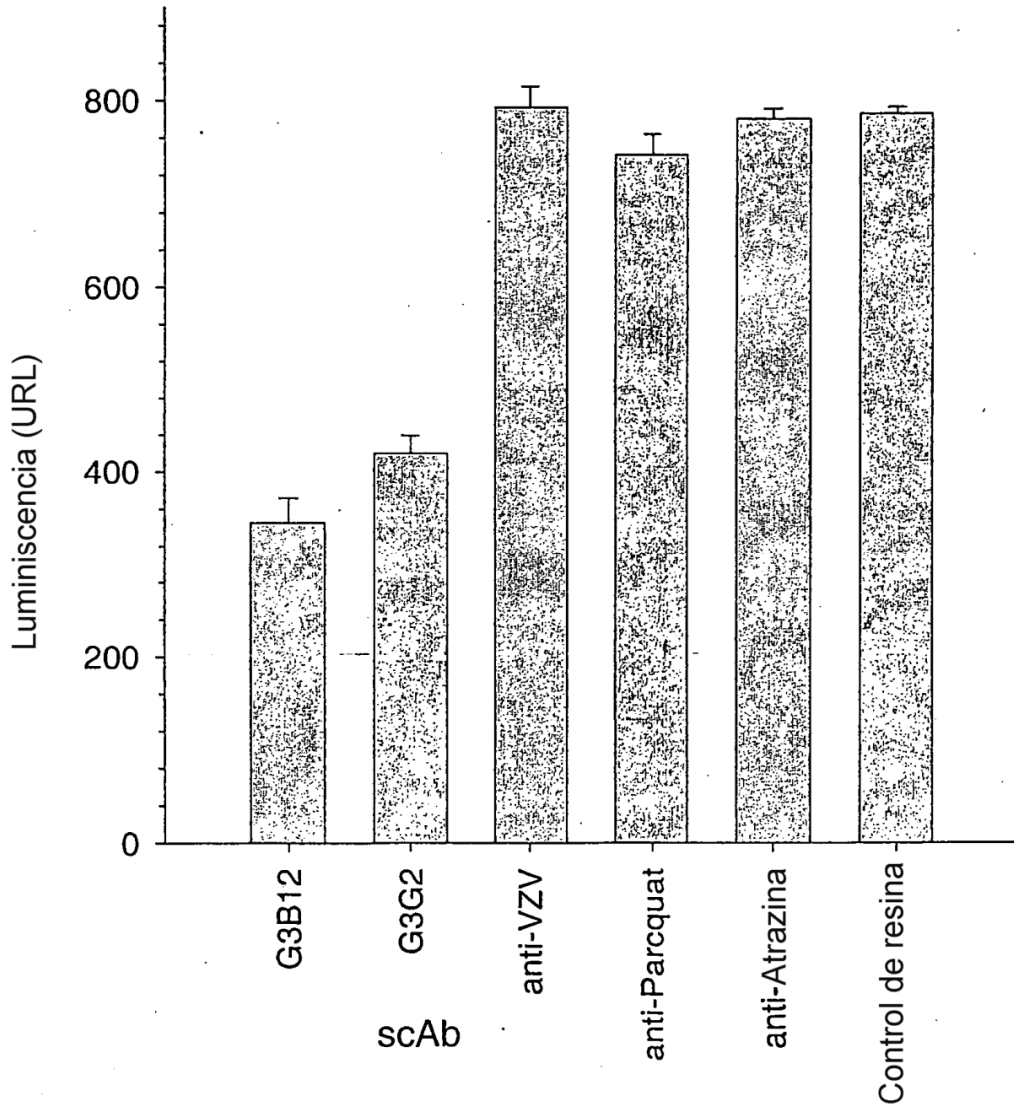


Figura 5.

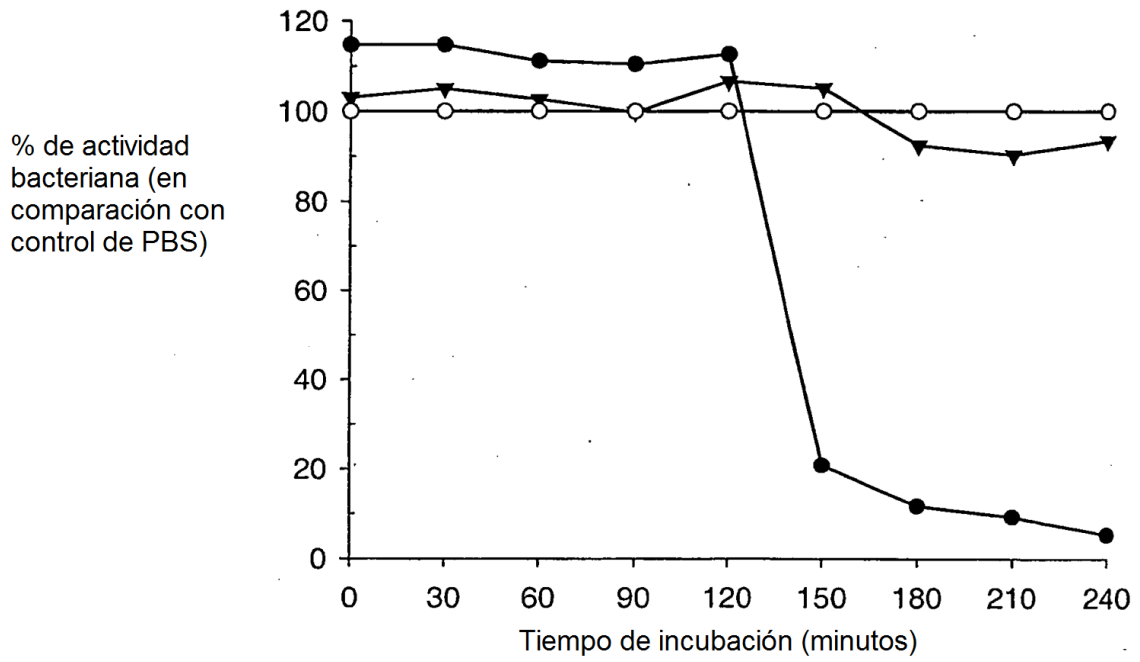


Figura 6.

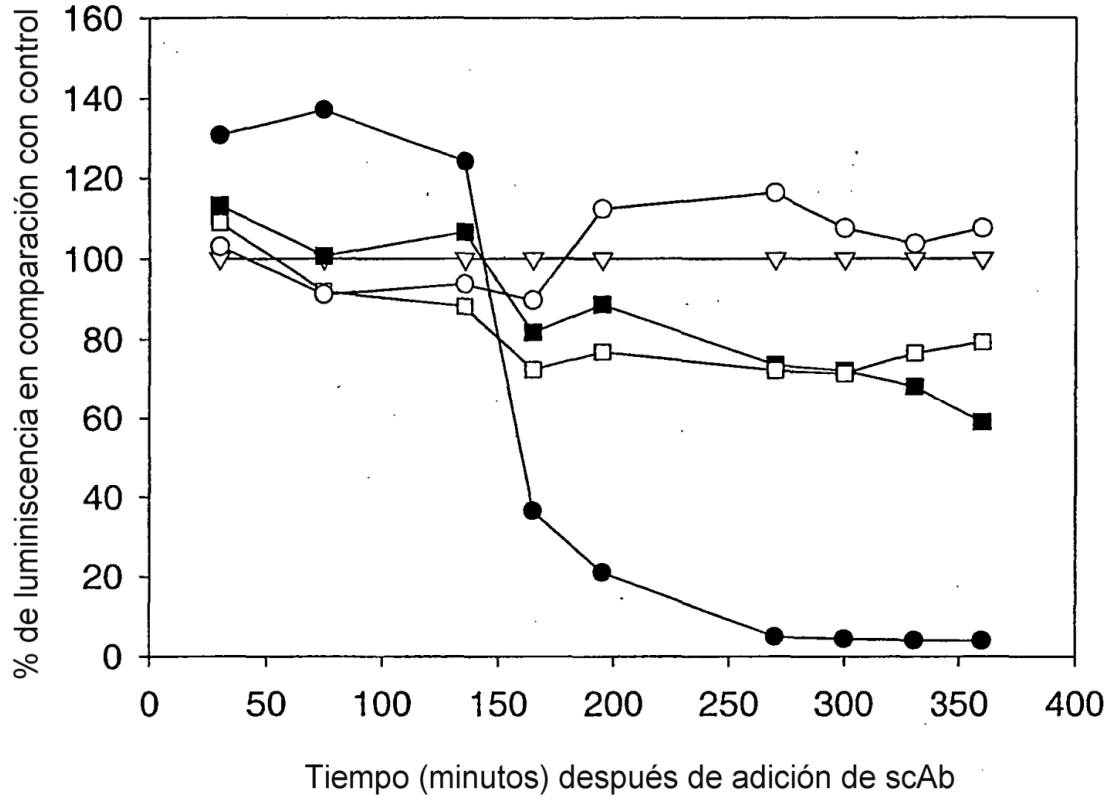


Figura 7.

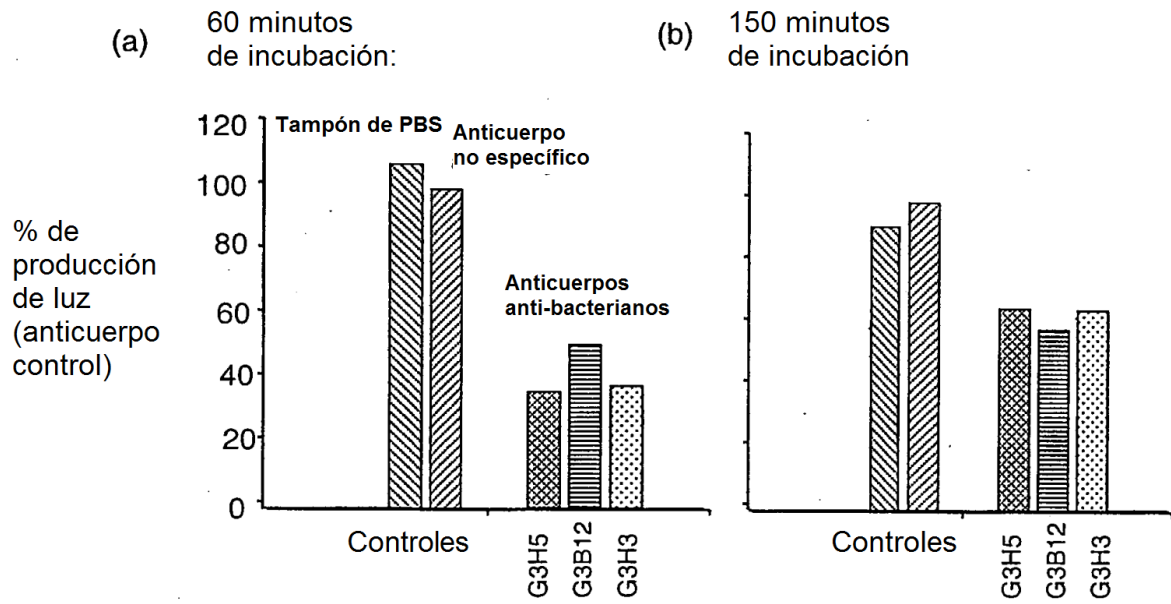
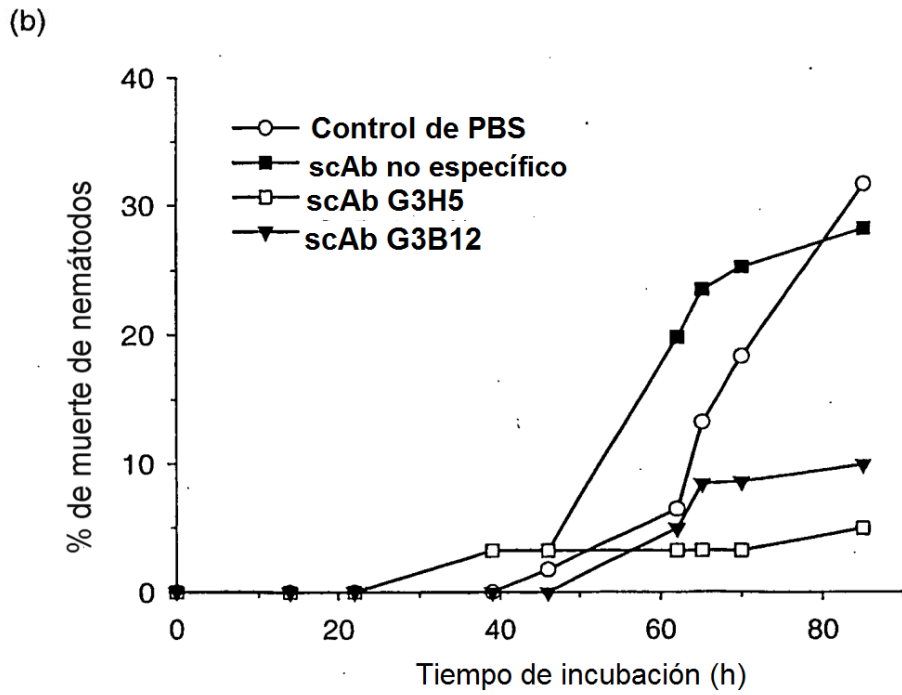
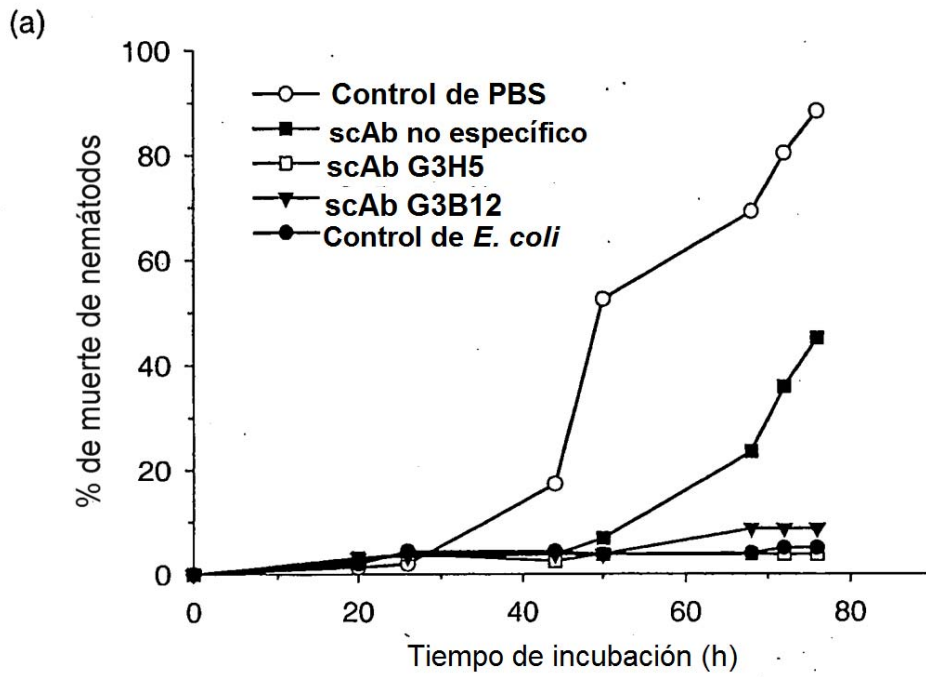




Figura 8.



**Tabla 5.**

Densidad óptica alta						Densidad baja	
Días de Inc	Control de PBS	scAb de control	G3H5	G3B12	G3H3	Control de PBS	Mezcla de 3 scAb
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	82
3	100	95	70	68	84	100	75
4	100	100	58	52	65	100	65
5	100	95	52	47	49	100	56

5

Figura 9.

