

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 383 958**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/195 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03756554 .6**

(96) Fecha de presentación: **01.10.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1546194**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2005**

(54)

Título: **Péptidos terapéuticos derivados de UspA1**

(30)

Prioridad:
02.10.2002 GB 0222764

(73)

Titular/es:
**UNIVERSITY OF BRISTOL
SENATE HOUSE TYNDALL AVENUE
CLIFTON BRISTOL BS8 1TH, GB**

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.06.2012

(72)

Inventor/es:
VIRJI, M.

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.06.2012

(74)

Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 383 958 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

Péptidos terapéuticos derivados de UspA1

Esta descripción se refiere a péptidos terapéuticos y en particular a péptidos terapéuticos que son útiles en la preparación de vacunas o en otros tratamientos de infecciones así como en la selección de compuestos con actividad farmacéutica potencial en el tratamiento de infecciones.

- 5 Los autores de la presente invención han identificado previamente que las moléculas de adhesión celular relacionadas con el antígeno carcinoembrionario (las CEACAM) son receptores para los patógenos de las membranas mucosas, especialmente para los patógenos respiratorios tales como *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*. Las CEACAM pertenecen a la familia del antígeno carcinoembrionario (CEA), un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. La familia de genes CEA comprende las sub-familias expresadas en la superficie (CEA) y las sub-familias segregadas (glucoproteína específica del embarazo, PSG). La sub-familia asociada a la membrana redefinida como CEACAM (molécula de adhesión celular relacionada con el CEA)²⁰ comprende varias glucoproteínas relacionadas de las cuales la CEACAM1 es la más ampliamente expresada en distintos tejidos humanos¹². Los estudios descritos por los autores de esta invención utilizaron principalmente células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con CEACAM1 (denominada previamente CD66a y BGPC) que contiene cuatro dominios extracelulares, una región TM y una cola citoplásmica corta (S) o una larga (L) (fórmula molecular: NA1BA2-TM-S o L). En adición, se utilizaron estructuras artificiales truncadas solubles que contienen uno o más de los dominios extracelulares. Los estudios previos demostraron que tanto la *Neisseria meningitidis* como el *Haemophilus influenzae* tienen como objetivo principal el dominio N de varias CEACAM^{7,9,10}. Dicho objetivo puede llevar a la unión a la superficie celular así como a la invasión celular⁹. En adición, las bacterias se pueden unir a las CEACAM en las células fagocíticas y en los linfocitos T y B. Dichas interacciones pueden llevar a la muerte de las células bacterianas⁸, a la muerte de las células diana o a la inhibición de la función inmunitaria, por ejemplo de los linfocitos T y B cuando la *N. gonorrhoeae* (estrechamente relacionada con la *N. meningitidis*) se une a las CEACAM de estos linfocitos^{21,22}.
- 10 25 El documento WO 98/28333 describe la secuencia de UspA1 de *M. catarrhalis* cepa O35E (UspA1 O35E) e identifica el epítopo que se une al anticuerpo (Mab 17C7). Chen *et al.* (1996) Infection and Immunity, 64, 6, 1900-1904 demuestra que el UspA1 de *M. catarrhalis* cepa O35E es inmunógeno en los ratones y sugiere su uso en una vacuna.
- 15 30 La presencia de ligandos de unión a CEACAM en la *Moraxella catarrhalis* y en el *Haemophilus influenzae* ha sido un hallazgo sorprendente para los autores de la presente invención ya que las CEACAM han sido asociadas desde hace tiempo con las proteínas Opa asociadas con la opacidad de la membrana externa de las *Neisseriae* y ni el *Haemophilus influenzae* ni la *Moraxella catarrhalis* producen proteínas Opa. En la descripción que sigue, se describe la presente invención con particular referencia a la infección de las membranas mucosas, especialmente de las membranas respiratorias, o a la infección del oído (especialmente otitis media) pero se debe entender que la invención encuentra igual utilidad en otras áreas tales como la mucosa genital o la uretra en las que están implicados los receptores CEACAM en una infección o en otros procesos de unión al receptor o en otra parte en una infección humana en la que las bacterias se pueden diseminar desde las superficies mucosas.
- 20 35 40 Los patógenos mucosales *Neisseria meningitidis* (Nm), *Haemophilus influenzae* (Hi) y *Moraxella catarrhalis* (Mx) son microorganismos específicos de los seres humanos y residen en el tracto respiratorio superior a partir del cual se pueden diseminar para causar infecciones graves. Las cepas de meningococos de distintos serogrupos se pueden transportar dentro de la nasofaringe en hasta el 25 % de los individuos sanos¹. Sin embargo, en muchos sujetos, el microorganismo invade la barrera mucosal para producir una de las enfermedades que avanzan más rápidamente y que son extremadamente graves. No se conocen bien los factores precisos que aumentan la susceptibilidad del hospedante a la infección por meningococos. Además, la protección limitada aportada por las vacunas específicas del grupo y la no inmunogenicidad de los polisacáridos del grupo B ponen de relieve la necesidad de estudios fundamentales para entender la susceptibilidad del hospedante y para identificar las características sub-capsulares destacadas que podrían servir como objetivos comunes para combatir a los meningococos. Los estudios realizados por los autores de la presente invención han proporcionado un entendimiento de la base molecular de la colonización meningocócica, la naturaleza de sus interacciones con las células de la barrera humana (epiteliales y endoteliales) así como con las células fagocíticas. En los últimos años, se ha investigado la base de la colonización mucosal por las *Neisseriae* comensales para entender las características que diferencian los patógenos colonizadores altamente peligrosos y los patógenos ocasionales pero graves tales como Nm. En adición, los estudios han determinado si las *Neisseriae* comensales se pueden usar o no como portadores de antígenos de vacunas potenciales de Nm.
- 25 45 50 55 Hasta un 75 % de los individuos sanos pueden llevar cepas que pertenecen a la especie *H. influenzae*². Aunque como resultado de la vacuna Hib, ha habido un espectacular descenso en la incidencia de la enfermedad tipo b en el mundo occidental, las enfermedades causadas por las cepas Hi no tipificables (NTHi) continúan siendo un problema

- importante. Las NTHi causan infecciones localizadas así como infecciones diseminadas incluyendo epiglotitis, otitis media, celulitis, neumonía, endocarditis, bacteremia y meningitis. La otitis media es uno de los principales problemas en la medicina pediátrica y las NTHi son responsables de más del 20 % de los episodios en niños durante el primer año de vida^{2,3}. Las NTHi se asocian también con infecciones agudas recurrentes y persistentes en los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y con fibrosis quística. No está clara la causa que determina las infecciones recurrentes por las NTHi en estos pacientes ni los múltiples episodios de otitis media en los niños^{2,3,4}.
- La *Moraxella catarrhalis*, otro residente del tracto respiratorio humano, se aísla a menudo de casos de infecciones localizadas junto con Hi. Ambos microorganismos se asocian con sinusitis y exacerbaciones de las enfermedades asmáticas^{5,6}. La Mx es la tercera causa más común de la otitis media en niños (se estima que es responsable de 3-4 millones de casos anualmente). Ella produce también infecciones del tracto respiratorio inferior en adultos especialmente en pacientes con EPOC⁵. En raras ocasiones, se ha asociado con infecciones diseminadas⁵. Tanto el Hi como la Mx causan infecciones persistentes y se cree que escapan de los mecanismos inmunitarios del hospedante y de los antibióticos por penetración del tejido⁴. Se han estudiado varias proteínas de la membrana externa de Mx con respecto a sus propiedades adhesivas. Sin embargo, se han identificado pocos receptores celulares para la Mx y muchos de los detalles de los mecanismos patogénicos siguen sin investigar^{4,5,6}.
- Un requisito principal para los patógenos de la mucosa respiratoria es el establecimiento de un contacto firme con las células epiteliales respiratorias. Los objetivos de estos patógenos trópicos humanos son moléculas humanas específicas y los estudios tienen que basarse en cultivos de tejidos y órganos humanos *in vitro*. La unión está mediada a menudo por estructuras bacterianas de fase variable y variables antigenicamente. En adición, está resultando cada vez más claro que la unión de los patógenos tiene múltiples facetas y la adaptación ambiental desempeña un importante papel en la forma de unión. Aunque se han empezado muchos estudios recientes para definir distintas etapas en los mecanismos complejos de elección de objetivos celulares, los detalles de la adaptación ambiental o de las interferencias hospedante-microbio todavía no se han descrito.
- Estudios recientes realizados por los autores de la presente invención han demostrado que Nm⁷⁻⁹ y Hi^{10,11} comparten algunos mecanismos distintos y otros comunes para seleccionar como objetivos ciertos receptores CEACAM de la superficie de células humanas¹².
- Además, los autores de la presente invención han identificado recientemente que los aislados clínicos de *Moraxella catarrhalis* tienen también como objetivo las moléculas CEACAM humanas. En adición, se ha encontrado ahora que una proteína de la membrana externa de Moraxella de alto peso molecular se une al receptor. Se ha demostrado la expresión de las CEACAM en distintos tejidos¹² incluyendo las células epiteliales respiratorias²⁴. Estas observaciones implican que el tener como objetivos específicos las CEACAM es particularmente ventajoso para las bacterias respiratorias y puede haber surgido como resultado de una evolución convergente.
- Entre los factores de adhesión elaborados por la *Neisseria meningitidis* están los pelos (fimbrias)^{13,14,16} y las proteínas de la opacidad de la membrana externa, Opa y Opc^{15,16}. Los pelos de Nm son estructuras de proteínas filamentosas largas compuestas de múltiples subunidades pilosas. Estas estructuras se consideran generalmente como las adhesinas más importantes de las bacterias capsuladas^{13,14,16} debido al hecho de que la cápsula enmascara parcial o totalmente los ligandos de la membrana externa dando como resultado la reducción de su eficacia funcional, mientras que los pelos atraviesan la cápsula y permanecen funcionales en las bacterias completamente capsuladas. Las Opa son una familia antigenicamente variable de proteínas y aparecen en la *N. meningitidis* así como en la *N. gonorrhoeae*. En los meningococos, los lugares 3-4 del gen opa codifican las proteínas de la transmembrana relacionadas con cuatro bucles expuestos en la superficie, tres de los cuales sufren variación de la secuencia^{16,17}. La Opc, otra proteína trans-membranal, es en gran medida invariable^{15,16}. Durante los últimos 12 años, los autores de la presente invención han investigado las relaciones estructura/función de los pelos de Nm, la virulencia potencial de las proteínas Opa y Opc y han identificado dos receptores humanos para las proteínas de opacidad de las neisseria. Además, el papel de los ácidos siálicos de superficie en las interacciones bacterianas con las células dianas humanas así como el papel de LPS y otros factores en la toxicidad celular han sido estudiados por los autores de la presente invención.
- La presente descripción se refiere a la identificación por los autores de la invención de un ligando de alto peso molecular aislado de la proteína de la membrana externa de Moraxella que se une a los receptores CEACAM.
- El ligando se puede caracterizar por su modelo de migración en SDS-PAGE que es indicativo de la familia USP de proteínas porque se rompe hasta los monómeros que tienen un peso molecular entre aproximadamente 60 y 150 kD cuando se hiere durante un período prolongado.
- El ligando se ha caracterizado en la cepa de Mx ATCC 25238 (MX2) como UspA1 y se ha determinado su secuencia de aminoácidos. El ligando se ha caracterizado además para determinar la región o dominio de unión al receptor, esto es, las características del péptido o asociadas con el péptido que se une al receptor.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un ligando aislado de la proteína de la membrana externa de *Moraxella catarrhalis* que se une a los receptores CEACAM, siendo definido dicho ligando en las reivindicaciones adjuntas.

- 5 El término ligando se usa aquí para indicar tanto la molécula entera que se une al receptor como cualquier parte de la misma que incluya el dominio de unión al receptor de tal modo que retenga la propiedad de unión al receptor. Por lo tanto, el término "ligando" engloba las moléculas que consisten solamente en el dominio de unión al receptor esto es la región o regiones peptídicas requeridas para la unión al receptor.
- 10 En una realización, la presente descripción se refiere a un ligando que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los residuos 463 a 863, 527 a 668, 527 a 863, 427 a 623, 427 a 623, 427 a 668, y 427 a 863 de la secuencia mostrada en la Figura 6, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o de hidroxilación, de sulfonación o de glucosilación u otro producto procedente de un proceso secundario de la misma.
- 15 Se pueden presentar también dominios de unión al receptor estructural y/o funcionalmente equivalentes en otras proteínas tipo UspA ya que aparecen proteínas híbridas en Mx que pueden contener epítopos mosaicos derivados de ambas proteínas UspA1 y UspA2²³. Los ligandos que comprenden tales dominios de unión al receptor equivalentes están también dentro del alcance de la invención.
- 20 Preferiblemente, el ligando o el dominio de unión al receptor es adecuado para uso en la prevención o tratamiento de una infección.
- 25 La presente descripción se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína ligando de la presente invención junto con los homólogos, polimorfismos, degenerados y variantes de corte y empalme de la misma.
- 30 El ligando de la invención, o las combinaciones del mismo se pueden utilizar en una vacuna o en otro tratamiento profiláctico de una infección.
- 35 La vacuna u otro tratamiento profiláctico puede comprender cualquier adyuvante, vehículo, excipiente, aglutinante, portador, conservantes y similares conocidos, que proporcionen una preparación farmacéuticamente aceptable del ligando para uso en el tratamiento de un paciente.
- 40 La invención proporciona también una preparación farmacéuticamente aceptable del ligando para uso en medicina. La preparación farmacéuticamente aceptable del ligando se puede usar en el tratamiento o prevención de cualquier enfermedad en la que están implicados los receptores CEACAM, por ejemplo en el tratamiento o prevención de una infección, una enfermedad respiratoria, enfermedades neoplásicas y condiciones asociadas de las enfermedades neoplásicas, y angiogénesis.
- 45 Preferiblemente, cuando se trata una infección, la infección es de la membrana mucosal, o se ha producido a través de ella, especialmente una infección respiratoria.
- 50 Lo más preferiblemente, el ligando se usa como una vacuna o como otro medio de profilaxis o tratamiento de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*. Idealmente, el ligando se usa como una vacuna o como otro medio de profilaxis o tratamiento de la otitis media.
- En un aspecto adicional, el ligando de la presente invención se puede usar también para identificar nuevos reactivos de bloqueo para uso como agentes terapéuticos para proteger a grupos vulnerables y al público en general frente a varios patógenos mucosales. Por ejemplo el ligando se puede usar para identificar análogos del receptor que son útiles para este fin.
- Por tanto la presente descripción proporciona también un ensayo de cribado para la identificación de nuevos reactivos de bloqueo para uso como agentes terapéuticos, comprendiendo el ensayo las etapas de selección de agentes terapéuticos potenciales por su capacidad para imitar el ligando de la presente invención o por su homología con el mismo. La invención además los agentes terapéuticos identificados por el ensayo de cribado mencionado.
- 45 Los componentes efectivos de la vacuna se pueden producir utilizando la información de los mecanismos que seleccionan como objetivo al receptor identificados por la presente invención tales como los imitadores de los péptidos biológicamente activos. Estos podrían prevenir la colonización/invasión bacteriana de la mucosa así como provocar anticuerpos que pueden ser bloqueantes, opsónicos y bactericidas.
- 50 Las secuencias de péptidos biológicamente activos derivados bacterialmente identificados por el ligando de la presente invención se podrían usar para estudiar los papeles de las CEACAM en el cáncer y en el desarrollo ya que

las moléculas están asociadas con estos procesos. Estas tienen también potencial como agentes anti-cáncer y para controlar o actuar de cualquier otra manera en el tratamiento de la angiogénesis.

En otra realización, la invención proporciona el uso de un ligando de unión al receptor CEACAM en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad en la que los receptores CEACAM están implicados en el objetivo celular del patógeno que causa la enfermedad según la reivindicación 12 adjunta.

Preferiblemente, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en infección, enfermedad respiratoria, enfermedad neoplásica y condiciones asociadas de enfermedad neoplásica, y angiogénesis.

Los medicamentos que se han descrito antes son de particular utilidad cuando el patógeno infecta, o entra a través de una membrana mucosal.

10 Los medicamentos que se describen aquí son particularmente útiles en el tratamiento o prevención de infecciones (enfermedades) causadas por *Moraxella catarrhalis*. Sin embargo, los ligandos como se describen aquí son útiles en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de cualquier enfermedad en la que están implicados los receptores CEACAM tales como las enfermedades causadas por *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*.

En una realización particularmente preferida, la enfermedad es otitis media.

15 Los ligandos de la invención se pueden usar también en el tratamiento de enfermedades causadas por otras bacterias orales, tales como la caries dental.

Las realizaciones de la presente invención serán descritas ahora meramente a modo de ejemplos no limitantes en los que se hace referencia a las siguientes figuras:

20 La Figura 1 es un gráfico que muestra los niveles de unión relativos de la construcción de receptor soluble CEACAM1-Fc ($1 \mu\text{g.ml}^{-1}$) sola (barras de la izquierda, blancas), o en presencia del anticuerpo específico YTH71.3 del dominio N de CEACAM1 (barras del centro, grises) para 3 cepas de Mx inmovilizadas sobre nitrocelulosa. La unión de CD33-Fc en cada caso fue despreciable (barras de la derecha, negras). Cepas 1, 2, 3: MX2 (ATCC 25238), MX3, MX4 (aislados clínicos) respectivamente. Se determinó la unión en un ensayo de *dot blot overlay* (hibridación puntual con recubrimiento) y se cuantificó la intensidad de las reacciones por análisis densitométrico utilizando el programa NIH Scion Image.

25 La Figura 2 muestra una transferencia Western de las proteínas de la cepa MX2 separadas sin disociarse (sin calentar, pista 1) o después de hervir durante 10 min (pista 2). Se recubrió la transferencia con CEACAM1-Fc ($1 \mu\text{g.ml}^{-1}$) y se detectó la unión al receptor con anticuerpo Fc anti-humano conjugado con peroxidasa de rábano y su sustrato.

30 La Figura 3 muestra transferencias Western de lisados de células enteras desnaturadas de las cepas MX2, MX3, MX4 (pistas 1-3 respectivamente) que fueron recubiertos con CEACAM1-Fc ($1 \mu\text{g.ml}^{-1}$; a), con anticuerpo anti-péptido UspA1 ($10 \mu\text{g.ml}^{-1}$; b) y con anticuerpo anti-péptido UspA2 ($10 \mu\text{g.ml}^{-1}$; c). Obsérvese el perfil de migración similar de las proteínas de unión a CEACAM1-Fc y las proteínas de unión a anti-UspA1 en las tres cepas. Los remanentes de proteínas no disociadas de alrededor de 250 kDa, (detectadas en este caso debido a la más alta sensibilidad de detección en el ensayo de la fosfatasa alcalina), se unen a CEACAM1-Fc. Estas sólo se reconocen débilmente por los anticuerpos anti-péptido, supuestamente porque los epítotos contenidos dentro de los péptidos sintéticos no están totalmente expuestos en la proteína nativa, que llegan a ser progresivamente expuestos cuando se desnaturiza el complejo. Los anticuerpos anti-UspA2 se unen a las proteínas de masas aparentes >200 kDa, que permanecen sin disociar después de hervir, una propiedad indicativa de las proteínas UspA2.

35 40 La Figura 4 muestra un espectro de masas de péptidos trípticos de la proteína de MX2 de unión a CEACAM1 después de la electro-elución (4a). El sumario de la entrada de datos en la base de datos de identificación de proteínas ProFound se muestra en (4b). Una tabla de las diez proteínas superiores identificadas y los valores de probabilidad se muestran en (4c). El detalle del candidato clasificado como número 1, en este caso UspA1 con una puntuación Z de 2,34 se muestra en (4d) indicando el número de péptidos apareados, sus posiciones dentro de la proteína, el % de la proteína cubierta y una lista de péptidos no apareados en esta ocasión.

45 La Figura 5 muestra el análisis de transferencia de Western de fragmentos trípticos de UspA1 de MX2. A: transferencia control utilizando anticuerpos secundarios (se utilizó mezcla de Fc anti-humano de cabra y de Ig anti-conejo de cabra en B y C). B: transferencia recubierta con CEACAM1-Fc y Fc anti-humano de cabra. C: transferencia recubierta con anticuerpos de conejo purificados por afinidad surgidos frente al péptido UspA1 (ETNNHQDQKIDQLGYALKEQGQHFNNR (SEQ ID NO:1)) (véase la Figura 6) y con Ig anti-conejo. * = pistas con marcadores de peso molecular – mostradas a la izquierda. Los péptidos señalados por las flechas dobles reaccionan fuertemente con CEACAM1-Fc (B) así como con los anticuerpos anti-péptido UspA1 (C). La unión de los anticuerpos anti-péptido UspA1 con el péptido de más bajo peso molecular (punta de flecha) identifica este fragmento de unión a

la CEACAM como el fragmento C-terminal contenido dentro de N-199 a K-863 de UspA1 de MX2 (véase la Figura 6).

La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína UspA1 de MX2. El péptido específico UspA1 usado para producir antisueros en conejos se muestra en negrita. La región de unión a CEACAM está contenida en el fragmento C-terminal de UspA1 de MX2 subrayado.

La Figura 7 muestra la separación de péptidos trípticos que reaccionan con las CEACAM. Se trató la *M. catarrhalis* cepa MX2 con 1 mg/ml de tripsina a 37 °C durante 10 min. Se sometió la muestra tripsinada a SDS-PAGE. Después de la tinción, se electroeluyó la región de 50 kDa durante la noche. Se secó por congelación la proteína electroeluida y se resuspendió en tampón y se aplicó a un segundo gel. Parte del gel se transfirió sobre nitrocelulosa y se identificaron las bandas de péptido que reaccionan con CEACAM mediante transferencia Western con recubrimiento (*Western blot overlay*) usando CEACAM1-Fc (*Blot*).

``*: indica las bandas de péptido enviadas para secuenciar el N-terminal.

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos de un péptido tríptico de la proteína UspA1 de MX2. El péptido tríptico de 50 kDa que se muestra (aminoácidos 463 a 863) se une a CEACAM y al antisero frente al péptido UspA1 (aminoácidos 753-780 subrayados). La secuencia N-terminal del péptido de alrededor de 50 kDa que se une a CEACAM es "ALESNVEEGL" (SEQ ID NO:4) que aparece después del sitio de escisión por la tripsina en el aminoácido 462.

La Figura 9 muestra una representación en diagrama de las posiciones de los cebadores usados para generar fragmentos del gen uspA1 para la expresión de péptidos recombinantes. El sitio de unión a CEACAM1 fue codificado por DNA amplificado por los cebadores P4 y P7, se diseñaron y se emplearon cebadores adicionales a lo largo de esta región (letras A-I).

La Figura 10 muestra la secuencia del fragmento recombinante 4-7. La región subrayada es la región N-terminal del péptido tríptico reactivo con la CEACAM1. El peso molecular previsto del fragmento 4-7 es alrededor de 26 kDa. El peso molecular previsto del fragmento marcado con His es alrededor de 28 kDa. La posición del péptido truncado se indica por 'T' (véase la Figura 13).

La Figura 11 es un diagrama que presenta la estrategia general de clonación, de expresión y de purificación para los péptidos UspA1 recombinantes, de la que es un ejemplo el sistema pQE30.

La Figura 12 es un mapa del vector pQE30.

La Figura 13 muestra la unión de CEACAM1-Fc en transferencia con recubrimiento (*blot overlay*) a los polipéptidos recombinantes 4-8 (pista 3), 4-T (pista 4) y 4-7 (pista 5). La pista 1 contenía un péptido recombinante control de treponema y la pista 2 contenía lisados de las construcciones 4-8 que contienen M15 no provocado.

La Figura 14 muestra transferencias Western que presentan la reactividad del péptido recombinante con anticuerpo anti-fragmento marcado con His (parte superior) y CEACAM1-Fc (parte inferior). Las pistas 2-4 contienen el péptido 6-8, la pista 1 contenía el péptido 4-8 como control. Las posiciones previstas de migración de los péptidos se muestran a la derecha. Ambos péptidos se unen al anticuerpo anti-His. Sin embargo, aunque el péptido 4-8 se une a CEACAM1-Fc, el 6-8 no lo hace.

La Figura 15 muestra que el polipéptido D-8 se une a CEACAM1-Fc (pista 1) pero no a CD33-Fc usado como control (pista 2). Se confirmó el origen de este péptido por la reactividad con el anticuerpo anti-fragmento marcado con His (pista 3).

La Figura 16 es un diagrama esquemático que muestra los tamaños relativos y las posiciones de los fragmentos rUspA1. Los 4-7 recombinantes se han usado para bloqueo bacteriano --véase la Figura 17.

La Figura 17 muestra los transfectantes CHO-CEACAM1 que fueron incubados en ausencia de péptidos (A) o con el péptido control recombinante (un péptido de treponema, B) o con el péptido UspA1 r4-7 (secuencia correspondiente a la cepa MX2, C y D) a las concentraciones mostradas y se añadieron las bacterias durante un período de 2 horas. Al final de esta incubación, se lavaron las bacterias no unidas y se detectaron las bacterias unidas con antisero policlonal anti-*M. catarrhalis* y anticuerpo secundario conjugado con TRITC. A 1 µg/ml se obtuvo una inhibición significativa de una cepa heteróloga de *M. catarrhalis* (MX1) y a 10 µg per ml, la unión de *H. influenzae* fue inhibida significativamente por el péptido recombinante UspA1 de *M. catarrhalis*.

Ejemplo 1. Cepas de *Moraxella catarrhalis* que se unen a CEACAM1-Fc humano mediante las proteínas UspA1

Las cepas de *Moraxella catarrhalis* (Mx) usadas en este estudio incluyen aislados clínicos (MX3 y MX4) así como la cepa de referencia comprada de la American Type Culture Collection (ATCC 25238, un cultivo clonal de ésta fue denominado MX2).

5 Los ensayos de recubrimiento (*overlay*) del receptor demuestran que Mx se une a las construcciones del receptor CEACAM1-Fc

Para evaluar la interacción de las cepas de *M. catarrhalis* con CEACAM1, se aplicaron bacterias (alrededor de $4-8 \times 10^6$) a nitrocelulosa, se secaron con aire y se bloquearon los sitios de unión no específicos en BSA-PBST al 3 %. Las tiras de nitrocelulosa se recubrieron o con CEACAM1-Fc (1-2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) solo o en presencia del anticuerpo YTH71.3 del N-domínio de CEACAM1. Se usó CD33-Fc (1-2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) como un control negativo. Se prepararon construcciones de proteínas químéricas como se ha descrito previamente¹¹. Se detectó la unión al receptor químérico por anticuerpos Fc anti-humanos de cabra conjugados con peroxidasa de rábano o con fosfatasa alcalina. Se desarrollaron transferencias (*blots*) con sustratos de diamino-benzideno y peróxido de hidrógeno o con nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolifosfato respectivamente. Todas las cepas Mx se unieron a CEACAM1-Fc pero no a CD33-Fc (Figura 1). La unión al receptor fue inhibida en presencia del anticuerpo monoclonal YTH71.3 lo que da a entender que las cepas se unieron al dominio N terminal del receptor. Por consiguiente, todas las cepas se unieron igualmente bien a la construcción N-Fc truncada de CEACAM1, que contiene solamente el dominio N (no se muestra).

Identificación de la proteína de unión a CEACAM1-Fc de *M. catarrhalis*

20 Se aplicaron lisados de células enteras de Mx (alrededor de 3×10^7) a pistas individuales de un gel de bis-tris poliacrilamida al 10 % (Invitrogen) sin tratamiento previo de calor o después de calentar a 100 °C durante 10 minutos y se sometió a electroforesis durante 45 min a 180 V. Se transfirieron las proteínas de los geles a membranas de nitrocelulosa utilizando condiciones convencionales de transferencia. Las membranas de nitrocelulosa se recubrieron con construcciones químéricas solubles como se ha descrito antes. En cada caso, se observó una única proteína que se unió específicamente a CEACAM1-Fc. La migración de la proteína sobre los geles era indicativa de la proteína UspA1 de Mx, puesto que cuando se aplicaron los lisados bacterianos sin desnaturización por calor, las proteínas que se unen a CEACAM1 migraron con una masa aparente >200 kDa mientras que cuando los lisados fueron calentados primero, las proteínas que se unen a CEACAM1 migraron con una masa reducida de alrededor de 92 kDa (Figura 2)

30 Anticuerpos producidos frente a UspA1 pero no aquellos frente a una proteína similar UspA2 que se une a las proteínas de unión a CEACAM1-Fc de las cepas Mx

35 Se diseñaron péptidos según las secuencias publicadas para las proteínas UspA de cepas de *M. catarrhalis*. Concretamente, ETNNRQDQKIDQLGYALKEQQHFNNR (SEQ ID NO:1; péptido UspA1) y KDEHDKLITANKTAIDANKAS (SEQ ID NO:6; péptido UspA2). Se acoplaron los péptidos a KLH mediante un residuo de cisteína N-terminal que fue incorporado y se usaron para inmunizar a los conejos (200 μg de péptido por conejo) a intervalos de 14 días, inicialmente con adyuvante de Freund completo y después con adyuvante de Freund incompleto. Se sangraron los conejos el día 0 y a intervalos de 14 días después de la inmunización. Se purificaron los anticuerpos policlonales utilizando el péptido apropiado acoplado a columnas AminoLink Plus (Pierce). Se utilizaron anticuerpos específicos de UspA a una concentración de 1-10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ para recubrimientos de transferencias Western y se detectaron con un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra acoplado a fosfatasa alcalina. Se desarrollaron transferencias (*blots*) como se ha descrito antes. La migración de las proteínas que se unen a CEACAM1-Fc sobre SDS-PAGE de las tres cepas Mx fue idéntica a la de las proteínas que se unen al anticuerpo UspA1 pero no a la de las proteínas que se unen al anticuerpo UspA2 (Figura 3)

El ligando de *M. catarrhalis* que co-precipita con CEACAM1-Fc se identifica como UspA1

45 Los cultivos de bacterias se suspendieron durante la noche en β D glucopiranósido de octilo 100 mM en PBSB que contenía un cóctel de inhibidor de proteasa (pic; PMSF 1 mM, E-64 1 μM , pepstatina A 1 μM , bestatina 6 nM y EDTA 100 μM). Se mezclaron las muestras de punta a punta durante la noche a 4 °C. Mientras tanto se incubaron 100 μl de proteína A acoplada con sefarosa CL-4B (Sigma) con 20 μg de CEACAM1-Fc o de CD33-Fc (usado como control) durante la noche a 4 °C y posteriormente se lavaron 3 veces con PBSB para eliminar cualquier receptor no unido. Se separó el material bacteriano insoluble por centrifugación a 15.000 g durante 30 min. Se incubó el extracto soluble con el complejo de receptor-proteína A sefarosa durante 2 h a 4 °C (a una proporción de 5×10^8 bacterias por μg de construcción de receptor). Después de un extenso lavado con β D glucopiranósido de octilo 50 mM y PBSB se analizaron las muestras por electroforesis SDS-PAGE y transferencia Western en condiciones de desnaturización.

En experimentos de co-precipitación con CEACAM1-Fc, la MX4 dio una proteína fuertemente teñida de alrededor de 97 kDa y la MX3 dio una proteína relativamente débilmente teñida de alrededor de 92 kDa. Las masas de las proteínas co-precipitadas correspondían a las observadas en los experimentos de recubrimiento (*overlay*) del receptor (mostrado en la Figura 3). Ninguna proteína co-precipitó con CD33-Fc. Las proteínas co-precipitadas se identificaron además como proteínas UspA1 puesto que se unieron al anticuerpo anti-péptido UspA1. En adición, después de la separación del gel, la proteína MX4 se sometió a espectrometría de masas MALDI-TOF (véase más adelante).

Identificación del ligando de CEACAM1 por espectrometría de masas MALDI-TOF

- a) Muestras para *overlay* Western. Los lisados de células enteras de MX2 y MX3 se sometieron a SDS-PAGE en geles acanalados y la banda de proteína que corresponde al ligando que se une a CEACAM1-Fc se electroeluyó del gel. Se concentró la muestra y se aplicó de nuevo en una única pista de un segundo gel, se sometió a electroforesis antes de la digestión de la proteína apropiada con la tripsina en el gel. Se analizaron los péptidos resultantes por espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz y detector TOF (Matrix-assisted Laser desorption/ionisation-time-of-flight (MALDI-TOF)). Se muestra un ejemplo del espectro de masas resultante para la proteína que se une a la CEACAM de MX2 (Figura 4a). Las masas de péptidos obtenidas se introdujeron en el sitio de identificación de proteínas ProFound y se obtuvieron los resultados que se muestran para esta proteína (Figura 4b, c). En este caso 10 masas de péptidos se apareaban con las masas previstas para los péptidos trípticos de UspA1 de *M. catarrhalis* cubriendo aproximadamente el 18 % de la proteína (Figura 4d). La puntuación Z estimada de 2,34 es claramente indicativa de que la proteína es UspA1 (las de puntuación Z >1,65 están por encima del percentil 95; http://129.85.19.192/profound_bin/webProFound.exe). En adición, otra banda de alto peso molecular de MX2 que no se une, se identificó como UspA2 después de un análisis similar. Similarmenete, para la cepa MX3, se identificaron las proteínas que se unen y las que no se unen a CEACAM1 como UspA1 y UspA2 respectivamente.
- (b) Muestras co-precipitadas: Para MX4, la proteína co-precipitada con CEACAM1-Fc (como se ha descrito antes) se identificó también como UspA1 por espectrometría de masas MALDI-TOF con una puntuación Z de 2,27 en toda la investigación taxonómica. Se realizó el apareamiento de 12 péptidos que cubren el 21 % de la proteína.

Por lo tanto este estudio ha identificado que la *Moraxella catarrhalis* tiene como objetivo la CEACAM1 humana a través de la proteína de alto peso molecular UspA1 en la cepa de referencia y en la cepa clínica indicadas.

Escisión enzimática de UspA1 y péptido recombinante

- (a) Los péptidos trípticos de UspA1 se unen a CEACAM1-Fc
- 30 Las suspensiones bacterianas de MX2 (10^{10} ml⁻¹) se trajeron con tripsina (Sigma) a concentraciones de 0,1-1 mg/ml y se incubaron durante 1-4 horas a 37 °C. Los lisados digeridos se disociaron en tampón de SDS-PAGE, se hirvieron y se sometieron a electroforesis. Después de transferir a nitrocelulosa, se recubrieron las transferencias (*blots*) con la construcción del receptor CEACAM1-Fc o con los anticuerpos anti-péptido UspA1 purificados por afinidad. Un pequeño fragmento que reacciona con el receptor se unió también a los anticuerpos específicos anti-UspA1 (Figura 5).
- (b) Localización del dominio de unión a CEACAM de UspA2 de *M. catarrhalis* cepa MX2
- Se trajeron suspensiones bacterianas de MX2 con tripsina a 1 mg/ml durante 10 minutos a 37 °C.
- La muestra tripsinizada se extendió sobre un gel de SDS-PAGE. Después de la tinción, se electroeluyó la región de 50 kDa durante la noche. La proteína electroeluida se secó por congelación y se resuspendió en tampón y se aplicó a un segundo gel. Se hizo transferencia de parte del gel sobre nitrocelulosa y se identificaron las bandas de péptido que reaccionan con CEACAM mediante transferencia Western con recubrimiento (*overlay*) utilizando CEACAM1-Fc. (Figura 7).
- 45 Las bandas de péptido que corresponden a péptidos de alrededor de 50 kDa y de alrededor de 150 kDa se sometieron a una secuenciación de N-terminal. Las secuencias N-terminales fueron ALESNVEEGL (SEQ ID NO:4) (péptido de alrededor de 50 kDa) y ALESNV (SEQ ID NO:7) (péptido de alrededor de 150 kDa). La proteína de 150 kDa es aparentemente un trímero de la proteína de 50 kDa ya que tienen la misma secuencia N-terminal. La secuencia N-terminal de este péptido UspA1 de MX2 se muestra en la Figura 8.
- (c) Péptido recombinante
- 50 El péptido recombinante MX2 de N-terminal que se construyó que consiste en los aminoácidos 1 a 449 de la secuencia mostrada en la Figura 6, no se une a la CEACAM. Esto indica además que el péptido tríptico de alrededor de 50 kDa que consiste en los aminoácidos 463 a 863 de la secuencia mostrada en la Figura 8, que tiene la secuencia N-terminal ALESNVEEGL (SEQ ID NO:4) contiene el dominio que se une a CEACAM.

Ejemplo 2. Identificación de los dominios de unión al receptor sobre múltiples determinantes de virulencia de los patógenos mucosales

La *N. meningitidis* y el *H. influenzae* tienen como objetivo las moléculas CEACAM humanas mediante ligandos que se unen a sitios de solapamiento sobre la CEACAM. El ligando o ligandos de Mx de la presente invención también tienen como objetivo el dominio N. Estas observaciones indican la posibilidad excitante de que características similares de ligandos de varios patógenos mucosales pueden estar implicadas en la elección como objetivo del receptor.

Puesto que las interacciones de Nm y Hi con las CEACAM se ven afectadas por las características estructurales de los dominios variables expresados en la superficie, esto sugiere que estos dominios pueden contener aminoácidos cruciales similares en una configuración espacial que son capaces de unirse al receptor y estos pueden ser conservados en proteínas variables de otra manera. De hecho los estudios de esta invención y los de otros autores dan a entender que los dos bucles hiper-variables de Opa (HV1 y HV2) pueden estar implicados en la elección como objetivo de la CEACAM^{9,18}. Una técnica potente que puede identificar posibles determinantes de interacciones entre ligandos y receptores es la expresión en fago (*phage display*), que se puede utilizar para identificar mimótopos (secuencias aleatorias que imitan los dominios de unión)¹⁹ así como aptámeros (secuencias más estrechamente relacionadas con la estructura original que inhiben la unión del ligando)²⁰.

La presente invención también hace altamente factible que el dominio del ligando Mx que se une a las CEACAM actúe como un imitador para otros patógenos mucosales que se unen a CEACAM y las características estructurales de este ligando ayudarán a identificar las características destacadas requeridas en los ligandos de Nm y Hi para tener como objetivo el dominio N de CEACAM. Los anticuerpos para el dominio Mx podrían tener el potencial de identificar otros ligandos que tienen la capacidad de tener como objetivo la misma región o similar, o una región estrechamente posicionada del receptor.

La identificación del dominio mínimo de unión a CEACAM1 de UspA1 de MX2 se realiza utilizando métodos conocidos de preparación de proteínas y tecnología de DNA recombinante. Los péptidos recombinantes se pueden seleccionar *in vitro* mediante los ensayos de recubrimiento (*overlay*) del receptor descritos antes para detectar el dominio de MX2 que se une al receptor. Los péptidos marcados con His se pueden separar sobre una columna de níquel, se puede separar la marca His si es necesario y se pueden utilizar para inmunizar conejos y ratones para obtener anticuerpos para posteriores investigaciones.

Un péptido de longitud adecuada para aplicaciones biológicas se puede determinar examinando las propiedades estimuladoras inmunológicas así como otras funciones tales como el bloqueo de la unión al receptor.

Ejemplo 3. Características destacadas del receptor requeridas para las interacciones con el ligando

Puesto que el dominio N de CEACAM es suficiente para las interacciones de las proteínas Opa, los autores de la presente invención utilizan la técnica de expresión en fago también para investigar los epítopos adhesivos del dominio N de CEACAM. El conocimiento de la región o regiones del receptor que se unen al ligando, que han sido estudiadas por los autores de la presente invención mediante mutagénesis de sustitución por alanina del receptor⁹ ha facilitado este estudio. En este caso también, está disponible un ensayo de recubrimiento del ligando para *biopanning* (selección por afinidad) (concentración de afinidad) de fagos químéricos que llevan secuencias del receptor.

Los análogos del receptor tienen el potencial de bloquear múltiples cepas producidas independientemente del tipo Opa puesto que los estudios han demostrado ya que a pesar de su variación antigenica, distintas proteínas Opa requieren características comunes del receptor para la adhesión primaria⁹. Es también de interés observar que los antígenos CEA se diseminan desde la mucosa intestinal y pueden bloquear la adhesión de las cepas de *E. coli* que se sabe que también tienen como objetivo las CEACAM. Esto ha sido propuesto como un mecanismo de inmunidad innata frente a los patógenos entéricos¹². Por lo tanto estos análogos del receptor actúan como agentes terapéuticos.

Ejemplo 4. Producción de péptidos recombinantes UspA1 de *Moraxella catarrhalis* que se unen a CEACAM

Sumario

Se realizó la amplificación por PCR de varios fragmentos por toda la longitud de UspA1 utilizando los cebadores que se muestran en la Figura 9. Se obtuvieron péptidos recombinantes como se describe más adelante. En la primera ronda, se encontró que el péptido recombinante que se une a CEACAM1 era codificado por DNA amplificado por los cebadores P4 y P8 pero no era codificado por la región entre P1 y P5. Además, los P4-P7 recombinantes se unían a CEACAM1 pero no los P6-P8. Se utilizaron cebadores adicionales dentro de la región de P4 y P7. La región D-7 retuvo la unión a CEACAM. La secuencia del fragmento 4-7 se muestra en la Figura 10.

Estrategia general de clonación, expresión y purificación para los péptidos UspA1 recombinantes

El fragmento 1-5 de UspA1 se produjo utilizando el sistema pBAD. Los productos de la PCR requeridos fueron sometidos a clonación TA en el vector pBAD y se usó la cepa TOP10 de *E. coli* para la amplificación. El resto del procedimiento fue como se muestra en la Figura 11 con la excepción de que el pBAD fue provocado utilizando arabinosa. El fragmento 4-7 se produjo utilizando ambos sistemas el pBAD y el pQE30 (Figura 11) con resultados similares de unión a CEACAM. El resto de los fragmentos se produjeron utilizando la estrategia de la Figura 11.

5 Vector y el sistema de expresión de pQE30

Se utilizó el vector pQE30 (Figura 12) conjuntamente con la cepa M15 de *E. coli*. La cepa M15 contiene el plásmido pREP4 que codifica un represor, que restringe la transcripción de DNA clonado en el pQE30. La adición de IPTG a una concentración de 1 mM evita la codificación de este represor y por lo tanto la transcripción de los fragmentos clonados al pQE30.

10 La estrategia de clonación

15 Los amplímeros de la PCR fueron ligados en primer lugar con el pCR2.1. Esto proporcionó un hospedante estable a partir del cual se podría recuperar el amplímero mediante digestión por restricción (BamHI/PstI), asegurando que cada extremo del fragmento de gen estaba cortado. Se digirió similarmente el pQE30 y se recuperó por purificación en gel, lo que aseguró también que ambos sitios de restricción habían sido cortados. El pQE30 y el amplímero UspA1 digeridos se ligaron durante la noche a 16 °C con ligasa T4 de DNA y se transformaron en la cepa M15 de *E. coli* competente para el CaCl₂. Se seleccionaron los transformantes sobre agar LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (25 µg/ml). Se tomaron 4-8 colonias y se cultivaron en caldo LB con antibióticos. Se recogieron 20 las bacterias procedentes de 3-4 ml de cultivo por centrifugación y se sometieron al método de minipreparación por lisis alcalina. Se digirió el vector purificado como anteriormente para chequear el inserto uspA1. Las bacterias que contienen pQE30 con un inserto de tamaño correcto se cultivaron en cultivos de 50 ml. y se provocaron con IPTG (véase más adelante). Las transferencias Western se utilizaron entonces para seleccionar la producción de proteína recombinante. En adición, se secuenciaron los vectores para determinar que el inserto era la región correcta de DNA 25 y para comprobar cualquier error de la secuencia.

Expresión y purificación

30 Las M15 que contienen construcciones pQE30/uspA1 se cultivaron en caldo LB (suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina) con agitación hasta OD₆₀₀ = 0,5 antes de la adición de IPTG hasta una concentración 1 mM. Se incubaron los cultivos durante 3-4 horas adicionales y se recuperaron las bacterias por 35 centrifugación. Se solubilizaron los sedimentos bacterianos en tampón B (urea 8 M, Tris 50 mM, etanol al 10 %, Tween al 2 %, imidazol 5 mM, pH 7) durante 1-3 horas y se separó el material de la membrana por centrifugación a 20.000 g durante 20 min. Se incubaron los sobrenadantes con resina de níquel durante 1-2 horas en un mezclador rotatorio, y se pasaron a través de una columna de polipropileno. Se lavó la resina retenida con 5-10 ml de tampón B y la proteína unida se eluyó con eluciones de 0,5 ml de tampón B suplementado con imidazol 100 mM. Las proteínas eluidas se comprobaron por SDS-PAGE antes de diáfragma para separar la urea y otras sales.

Fragmentos recombinantes

A: Fragmentos 1-5 y 4-8

Estos fragmentos producidos por el sistema pBAD demostraron que el fragmento 1-5 no se había unido a CEACAM1 pero el 4-8 sí lo había hecho.

40 B: Fragmentos 4-8, 4-8T, 4-7 y 6-8 producidos utilizando el sistema pQE30.

45 El fragmento 4-8 fue el primer fragmento de rUspA1 producido y se encontró que se unía a CEACAM1 con una alta afinidad en los ensayos de blot-overlay. En adición al péptido 4-8 rUspA1 de longitud completa, se observó un proteína más pequeña truncada. Este péptido (denominado 4-T) también se unió a CEACAM1 y pareció que se expresaba a niveles más bajos que el 4-8 (Figura 13). El análisis de secuencia de pQE30/4-T encontró que un desapareamiento (CAA a TAA) llevaba a un codón de terminación en el residuo Q624 (véase la Figura 10).

Los péptidos 4-7 y 6-8 se produjeron con el fin de descartar la posibilidad de que un segundo sitio de unión a CEACAM apareciera en 6-8. Como se había previsto para el péptido 4-T, el 4-7 demostró que se une a CEACAM (Figura 13) pero el 6-8 no lo hace (Figura 14).

C: Fragmentos D-8 y D-7 producidos por el sistema pQE30

50 Se encontró que ambos fragmentos de rUspA1 D-8 (Figura 15) y D-7 (no se muestra) se unen a CEACAM1.

Actividad biológica del péptido 4-7 recombinante

La *M. catarrhalis* cepa MX1 y el *H. influenzae* cepa Rd se unen a las células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con CEACAM1. Su unión puede ser bloqueada con el péptido 4-7 recombinante UspA1 de *M. catarrhalis* pero no con un péptido control (Figura 17).

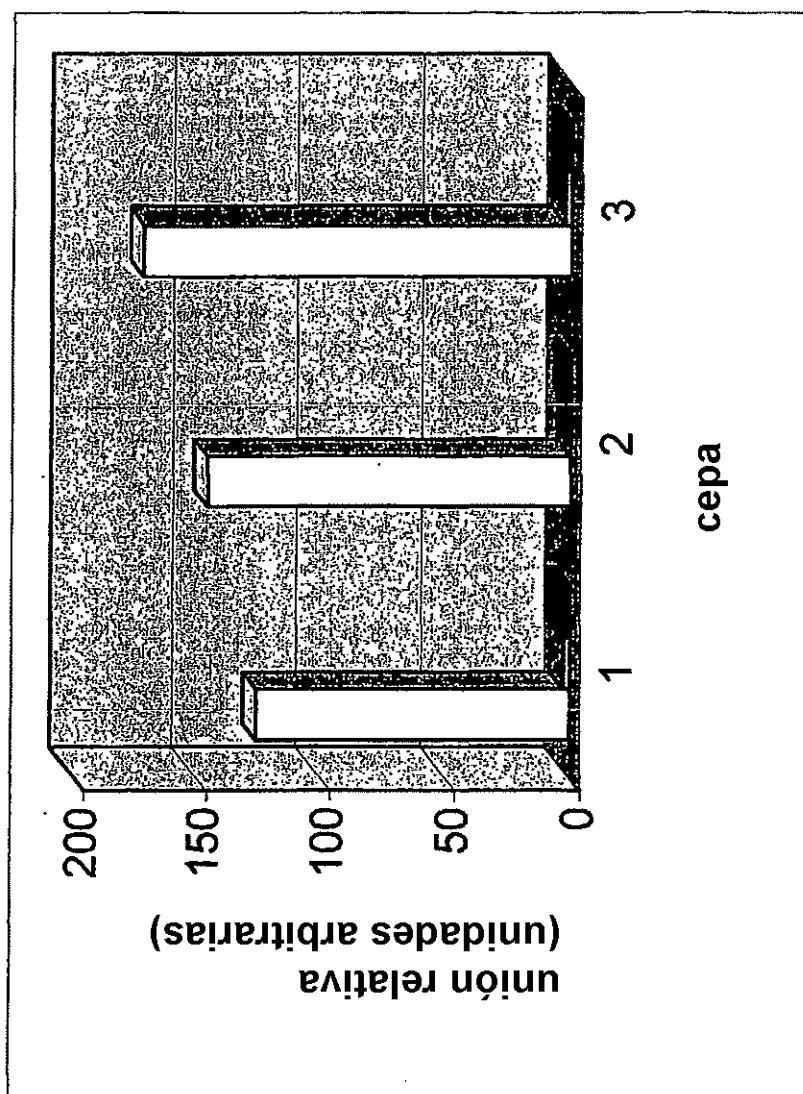
5 **Referencias**

1. Cartwright, K. et al. 1995. In *Meningococcal Disease*. John Wiley & Sons.
2. van Alphen, L. & van Ham, S. M. 1994. *Rev Med Microbiol* 5:245.
3. Foxwell, A. R. et al. 1998. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:294.
4. van Alphen, L. et al. 1995. *Am J Respir Crit Care Med* 151:2094.
- 10 5. Karalus, R. et al. 2000. *Microbes & Infection* 2:5
6. Kraft, M. 2000. *Clin Chest Med* 21:301.
7. Virji, M. et al. 1996. *Mol Microbiol* 22:929.
8. Virji, M. et al. 1996. *Mol Microbiol* 22:941.
9. Virji, M. et al. 1999. *Mol Microbiol* 34:538.
- 15 10. Virji, M. et al. 2000. *Mol Microbiol* 36:784.
11. Hill, D. et al. 2001 *Mol Microbiol* 39: 850.
12. Hammarstrom, S. 1999 *Cancer Biol* 9:67.
13. Stephens, D. S. 1989. *Clin Microbiol Rev* 2:S104.
14. Virji, M. et al. 1991. *Mol Microbiol* 5:1831.
- 20 15. Achtman, M. 1995 *Trends Microbiol* 3:186.
6. Merz, A. J. & So, M. 2000 *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:423.
17. Woods, J. P. & Cannon, J. G. 1990 *Infect Immun* 58:569.
18. Wang, L-F & Yu, M. 1996 In *Methods Mol Biol* 66:269 (Morris, G. E. ed). Humana Press.
19. Colman-Lerner. 2000. *Trends Guide* p. 56 (Wilson, E. ed.).
- 25 20. Beauchemin, N., et al., 1999. *Exp Cell Res* 252: 243-249.
21. Boulton I. C. & Gray-Owen S. D. 2002. *Nat Immunol* 3(3):229-36.
22. Chen T. et al., 2001. *J Leukoc Biol* 70(2):335-40.
23. Lafontaine, E. R., et al., 2000. *J Bacteriol* 182: 1364-1373.
24. Virji, M. 2001. *Trends in Microbiology*, 9: 258-259.

REIVINDICACIONES

1. Un ligando que es una parte de la molécula entera de UspA1 que incluye el dominio de unión al receptor CEACAM, consistiendo dicho ligando en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o un fragmento de la misma requerido para la unión al receptor CEACAM.
2. El ligando según la reivindicación 1, en el que el ligando consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3.
3. Un medicamento que comprende el ligando según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglutinantes, portadores, o conservantes, farmacéuticamente aceptables.
4. El medicamento según la reivindicación 3, para el tratamiento o profilaxis de una infección.
5. El medicamento según la reivindicación 3, para el tratamiento o prevención de una enfermedad en la que los receptores CEACAM están implicados en el objetivo celular del patógeno que causa la enfermedad.
- 10 6. El medicamento según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que la infección es de una membrana mucosal o ha aparecido a través de una membrana mucosal.
7. El medicamento según la reivindicación 6, en el que la infección es causada por *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* o *Moraxella catarrhalis*.
- 15 8. El medicamento según la reivindicación 3, para la profilaxis o tratamiento de la otitis media.
9. El uso de un ligando según la reivindicación 1, en un ensayo de cribado para la identificación de nuevos reactivos de bloqueo para uso como agentes terapéuticos que comprende seleccionar agentes terapéuticos potenciales por su capacidad para imitar a dicho ligando, o por su homología con dicho ligando.
- 20 10. Una vacuna que comprende el ligando según la reivindicación 1, y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglutinantes, portadores, o conservantes, farmacéuticamente aceptables.
11. Un ligando según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en el tratamiento o prevención de una infección.
- 25 12. Un ligando que se une al receptor CEACAM, que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o un fragmento de la misma que retiene la capacidad de unión al receptor CEACAM, para uso en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad en la que los receptores CEACAM están implicados en el objetivo celular del patógeno que causa la enfermedad.
13. Un ligando que se une al receptor CEACAM según la reivindicación 12, para uso según la reivindicación 12, en el que el patógeno que causa la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* o *Moraxella catarrhalis*.
- 30 14. Un ligando que se une al receptor CEACAM según la reivindicación 13, para uso según la reivindicación 13, en el que la enfermedad es otitis media.

Figura 1



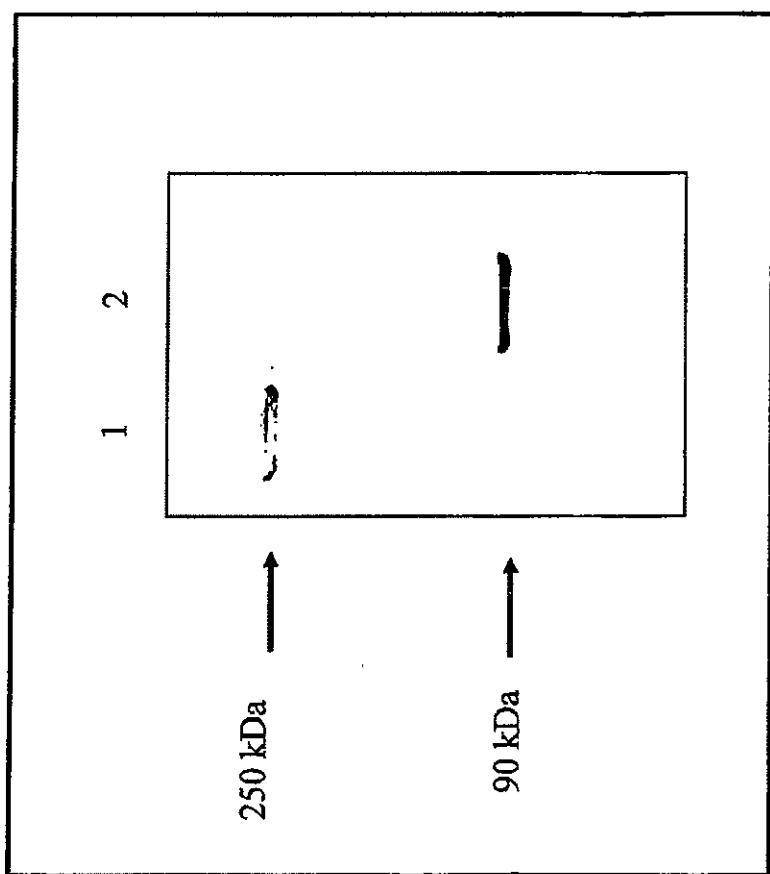


Figura 2

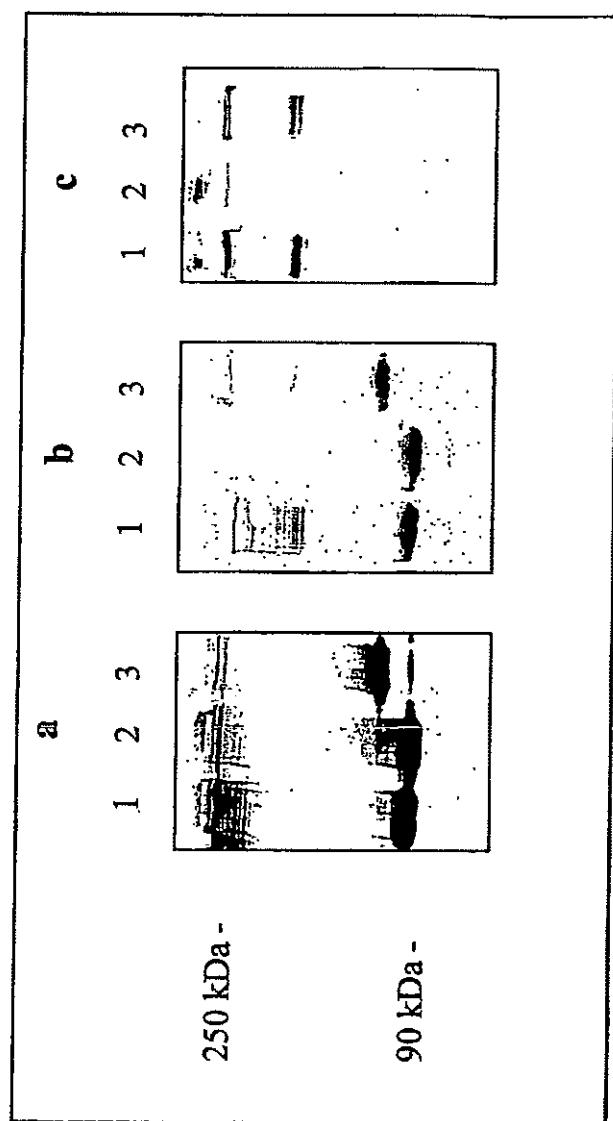


Figura 3

ES 2 383 958 T3

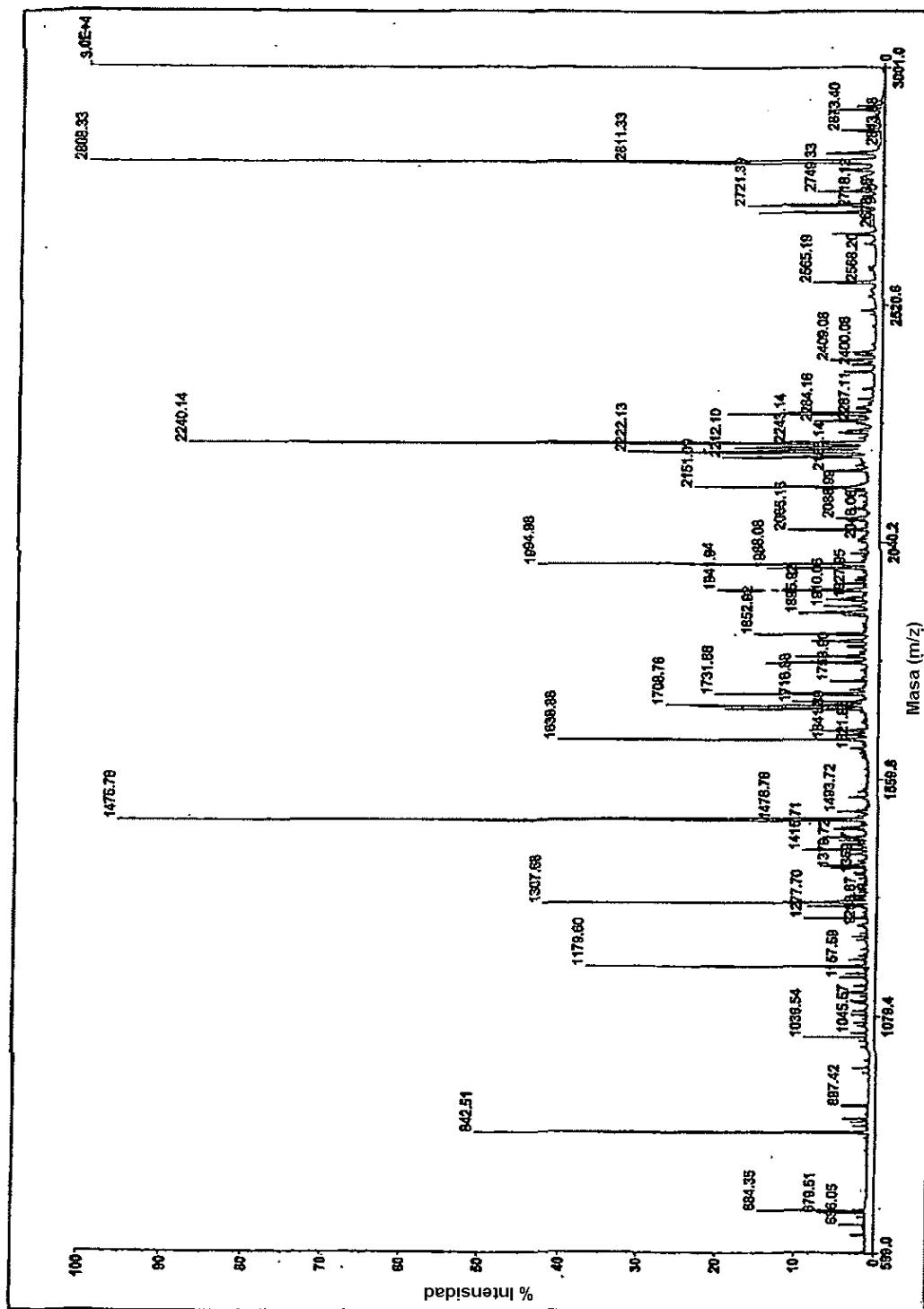


Figura 4a

Sumario de entradas	
Fecha y hora	Miércoles 2 de agosto 11:55:23 UTC (Tiempo de investigación: 17,38 s)
Identificación de la muestra	11020EE20-7-01
Base de datos	NCBInr(2001/07/29)
Categoría Taxonómica	Todas las categorías
Intervalo de masas de las proteínas	80-100 kDa
Intervalo de la proteína	pl 0,0 -14,0
Investigar	Proteína simple solamente
Química de digestión	Tripsina
Pérdida de masa corte	I
Modificaciones	Ninguna
Estado de carga	MH+
Masas de péptidos (Da, media)	
Tolerancia (media)	1,00 ppm
Masas de péptidos (Da, monoisotópico)	679.514 684.348 842.510 897.421 1036.535 1126.566 1157.592 1179.598 1277.702 1306.538 1302.633 1306.630 1307.681 1311.689 1379.718 1383.708 1415.714 1424.752 1434.769 1438.723 1440.774 1458.736 1474.731 1475.757 1637.850 1638.859 1648.850 1657.807 1700.854 1701.869 1707.781 1715.823 1716.858 1731.876 1757.875 1794.809 1807.903 1826.798 1837.968 1851.920 1890.972 1895.922 1909.054 1922.930 1927.947 1940.931 1953.978 1987.056 1993.976 2016.988 2064.139 2081.967 2087.924 2130.075 2184.140 2211.104 2221.129 2225.129 2230.218 2239.136 2261.122 2283.164 2397.197 2299.182 2383.981 2399.049 2408.087 2564.193 2663.246 2705.179 2717.129 2720.281 2748.314 2781.921 2791.004 2792.915 2805.359 2807.327 2825.331 2872.402 2914.526 2921.383
Tolerancia (MON)	20,00 ppm
Número de péptidos	82

Figura 4b

ProFound-Sumario de los resultados de investigación										The Rockefeller University Edition			
Clasificación Probabilidad Puntuación 7 Información de proteínas y utensilios de análisis de secuencia (T) secuencias investigadas										%	pI	kDa	C
Proteínas candidatos para investigación	C2BABEG:01DC-7445F:09 [731183]												
1.0e-003	2.34	IgM33174ebI AAF34631AF13608	[IgM33174ebI AAF34631AF13608 USA]	Moraxella catarrhalis	TAF113608 USA	18	5.7	90.52	⑧				
1.0e-003		TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076	[TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076 USA]	Moraxella catarrhalis	USPAI	14	5.4	91.86	⑧				
1.0e-003		TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076	[TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076 USA]	Moraxella catarrhalis	USPAI	15	5.7	90.56	⑧				
1.0e-003		TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076	[TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076 USA]	Moraxella catarrhalis	USPAI	13	5.3	95.75	⑧				
1.0e-003		TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076	[TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076 USA]	Moraxella catarrhalis	USPAI	11	5.6	96.93	⑧				
1.0e-003		TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076	[TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076 USA]	Moraxella catarrhalis	USPAI	8	5.6	85.92	⑧				
1.0e-003		TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076	[TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076 USA]	Moraxella catarrhalis	USPAI	13	5.7	93.4	⑧				
1.0e-011		TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076	[TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076 USA]	Moraxella catarrhalis	USPAI	12	4.6	89.07	⑧				
1.0e-012		TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076	[TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076 USA]	Moraxella catarrhalis	USPAI	10	9.2	97.92	⑨				
1.0e-013		TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076	[TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076 USA]	Moraxella catarrhalis	USPAI	11	6.1	80.62	⑧				
1.0e-013		TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076	[TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076 USA]	Moraxella catarrhalis	USPAI	7	2	6.0	97.36	⑧			
1.0e-013		TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076	[TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076 USA]	Moraxella catarrhalis	USPAI	8	5.3	82.91	⑧				
1.0e-013		TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076	[TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076 USA]	Moraxella catarrhalis	USPAI	9	5.3	82.91	⑧				
1.0e-013		TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076	[TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076 USA]	Moraxella catarrhalis	USPAI	2	5.2	94.00	⑧				
1.0e-013		TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076	[TAF113608237ebI AAF34022.1AF181076 USA]	Moraxella catarrhalis	USPAI	10	5.1	98.47	⑧				

Figura 4c

ProFound-Detalles de los resultados de la investigación

Detalles del candidato clasificado como nº 1 en la investigación de

C2BABE89-01DC-7445SF3E9

61545-1741gblAAD134651IAFI136061 (AFI13606) USA [Moraxella catarrhalis]

Identificación de la muestra: 1020EE20-7401 (pass.10)

Péptidos medios : 82

Péptidos apareados : 10

Mínima cobertura de secuencia: 18

Version 4.10.5
The Rockefeller University Edition

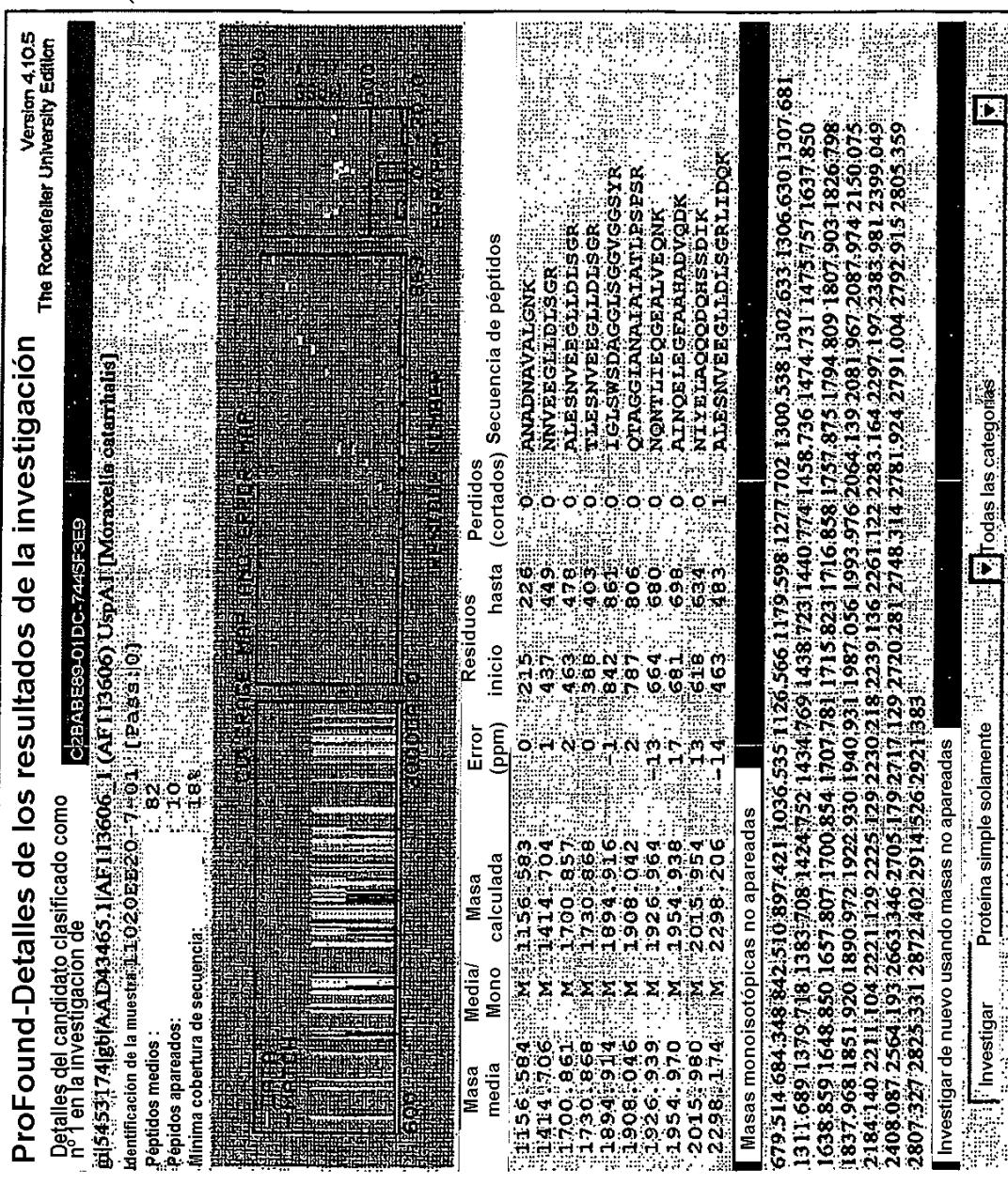


Figura 4d

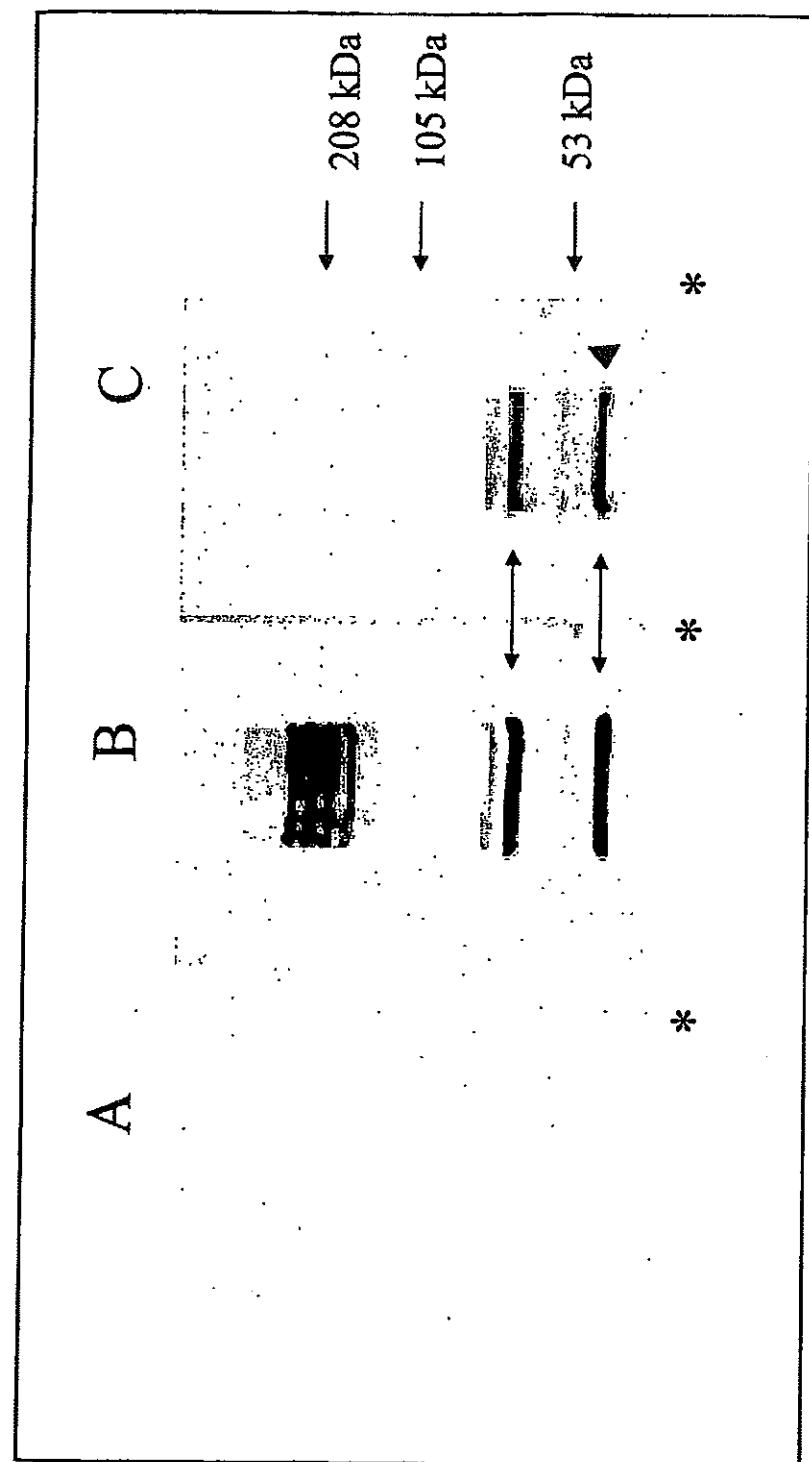


Figura 5

Figura 6

1⁹MNKYYVKKNAAGHLYACSEFAKGHTIKAVLGSLLIVGLMATTASACKVKGATNKISGGDNNTANGTYLTIGGGDY 78
 7⁹NKTKGRYSTIGGGLFNEATNEYSTIGSGYNKAKGRYSTIGGGYNEATNQYSTIGGGDNNTAKGRYSTIGGGYNEATI 168
 18⁹ENSTVGCGGYNQAKGRNSTVAGGYNEATGTDSTIAGGRKNQATGKGSFAAGIDNKANADNAVALGNKNTIEGENSVA 238
 23⁹TGSNNJMKGGQNVLGSNTTNAQNGSVLGHNTAGKAATIVNSAEGGSLTGAGASKIGNGTVSVGKKGERQL 316
 31⁹TVHYGAGEISDTSDAVNGSQUHLATWQNKAQDIDKOLPDEVGLGEENINSLEGEFFNNQDAIAKNQADIKTLESNVEEG 398
 39⁹LLDLSGRLIDQKADIDNNNNNIELAQQQCDQHSSDPIKTLKNMVEEGGLDSGRLLIDQKADLTIDKIKALESNVEEGLLDI-SGRLI 480
 48⁹DOKADIANKNQADIAQDIAQNTDQPLAAYNELQDAYAKQQTEADALNKAASANTDRIATAELGIAENKKDAQIAKACANEN 568
 56⁹KDGIAKKNQADICLHDKKITNLGHSMVARAVGNNTQGVATNKAIDAKNQADIANNIKNIYELAQQQDQHSSDIKTIAK 638
 63⁹VSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKNQNTLIEQGEALVEQNKAINEQELGFAAHADYQDKQILQNOQADITINKTAIEQNN 718
 72⁹RTVANGFEIEKNIKAGIATNKQCELLONDRNRINETNNHODQKIDQLGYALKEQQQHFNNRISAYERQTAGGIANAJAIL 801
 80⁹PSPSPSRAGEHHVLFGSYHNGQAAYSLGAAGLSPTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGVGCCSYRWK 833 (SEQ ID No:2)

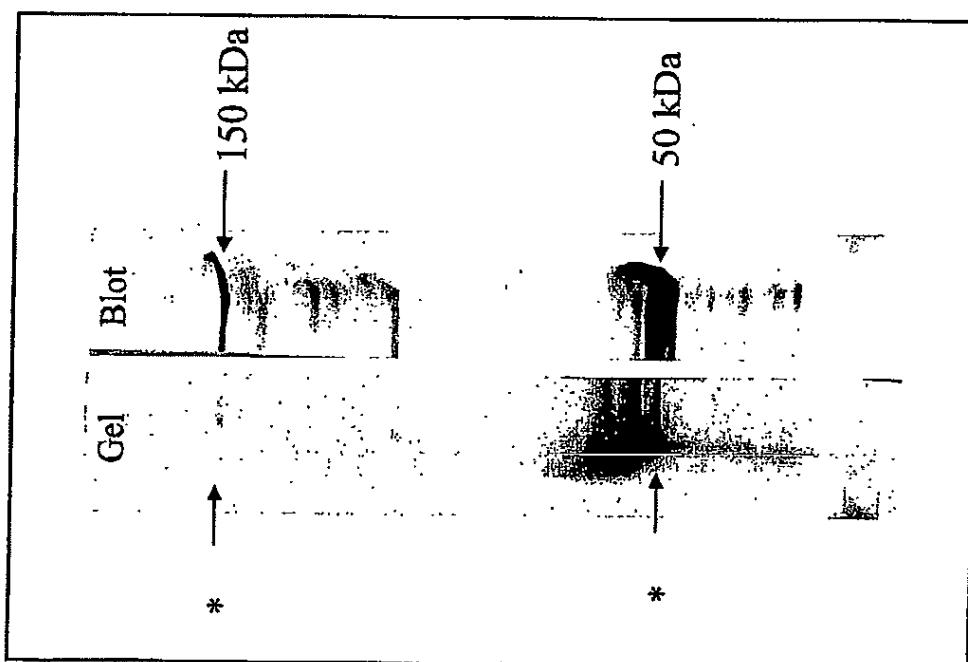


Figura 7

Figura 8

463 ALESNVEEGLLDLSGRU⁴⁸⁰
481 DQKÀDIAKNQADIAQNQTIDQDLAAYNELQDAYAKQQTEADALNKASSANTDRIATAELGIAENKKDAQIAKAQANEN⁴⁸⁸
680 KDGIAKKNQADIQLHDKKITNLGILHSMVARAVGNINTQGVATNKAJAKNQADIANNIYELACQQDHSSDIKTLAK⁶⁹⁸
698 VSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKNQNTLJEQQGEALVEQNKAINELEGFAAHADVQDKQILQMNQADITTNKTAIEQNN⁷¹⁸
720 RTVANGFEIEKNAKGIAINKQEIJLQNDRLNRINETNNHQDQKIDQLGYALKEQQQHENRISAVERQTAGGIANAIAATL⁸⁰¹
802 PSPSPSRAVGENHVLFGSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK⁸⁸³ (SEE ID NO:3)

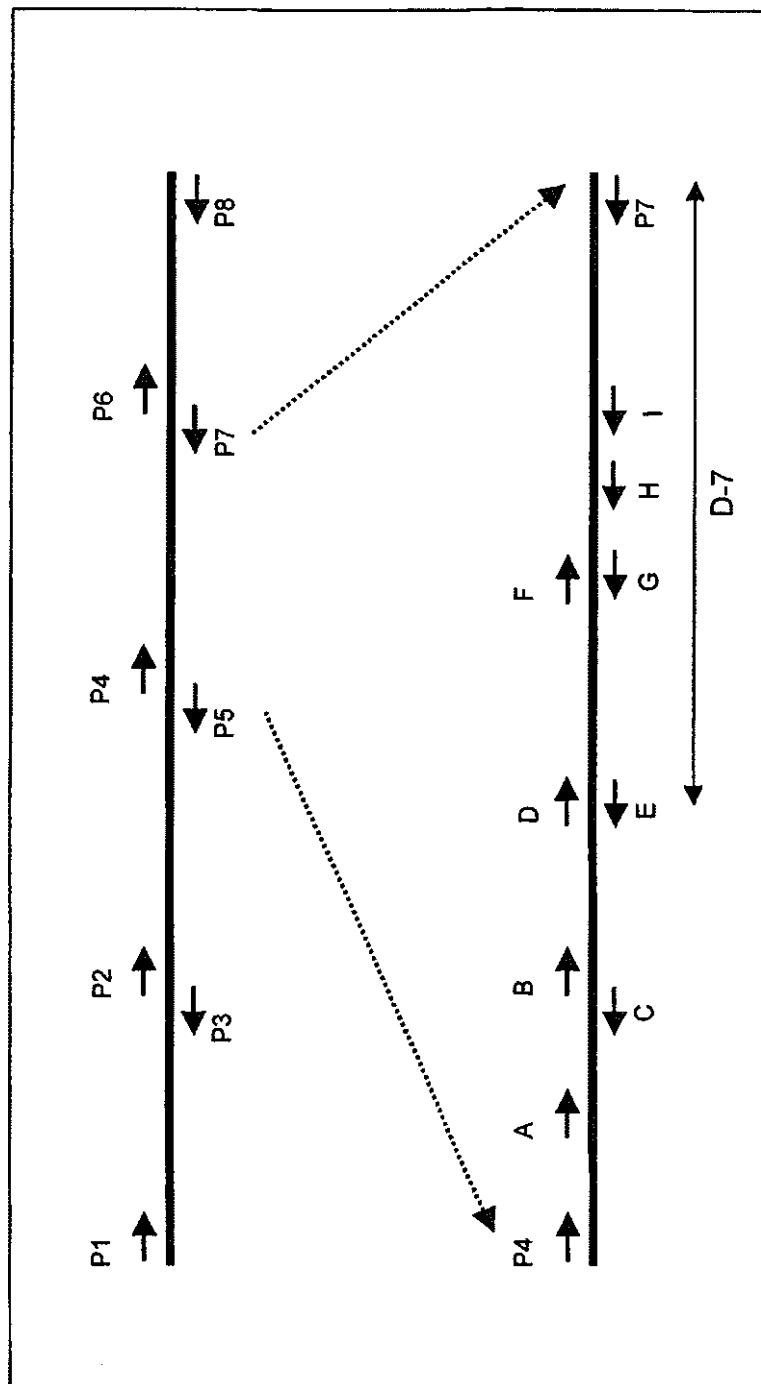


Figura 9

427 qhssdiktknnveeglldisgrlidqkadltkdikalesnveeglldsgrl⁴⁸⁰

481 d^qkadiaknqadiaqngt^diqdlaaynelqdayakqqteaidahnkassantriataelgiaenkdaqiakaqamen⁵⁵⁹

560 kdgiaknqadiqlhd^kkitnlgilhsimvaraygnntqgyatokadiaknqadiannikniyelaqqdqhssdiktlak⁶³⁸

639 ysaantdriaknkaadasfetltknqntl⁶⁶⁸ (seq 10 no:5)

T

Figura 10

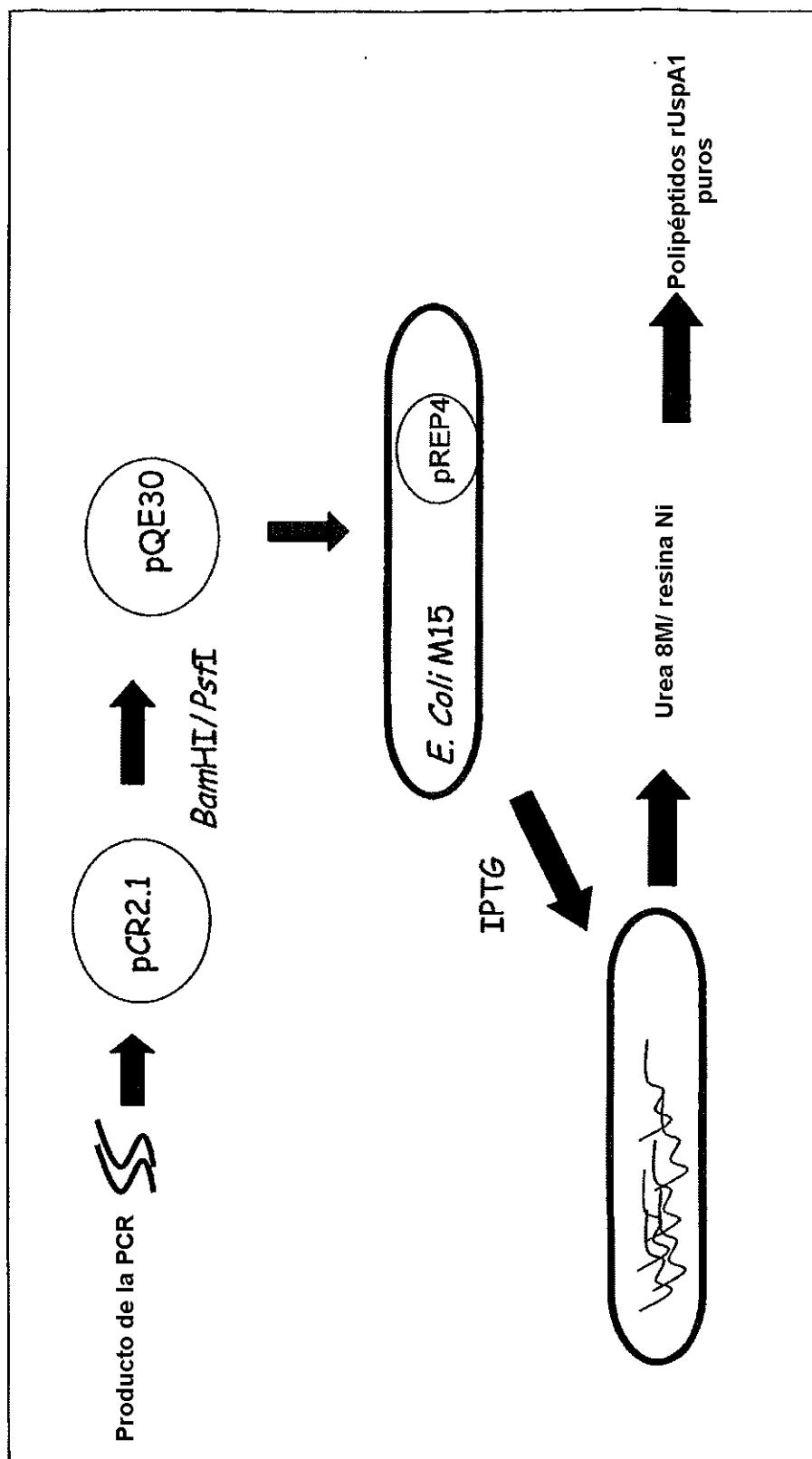


Figura 11

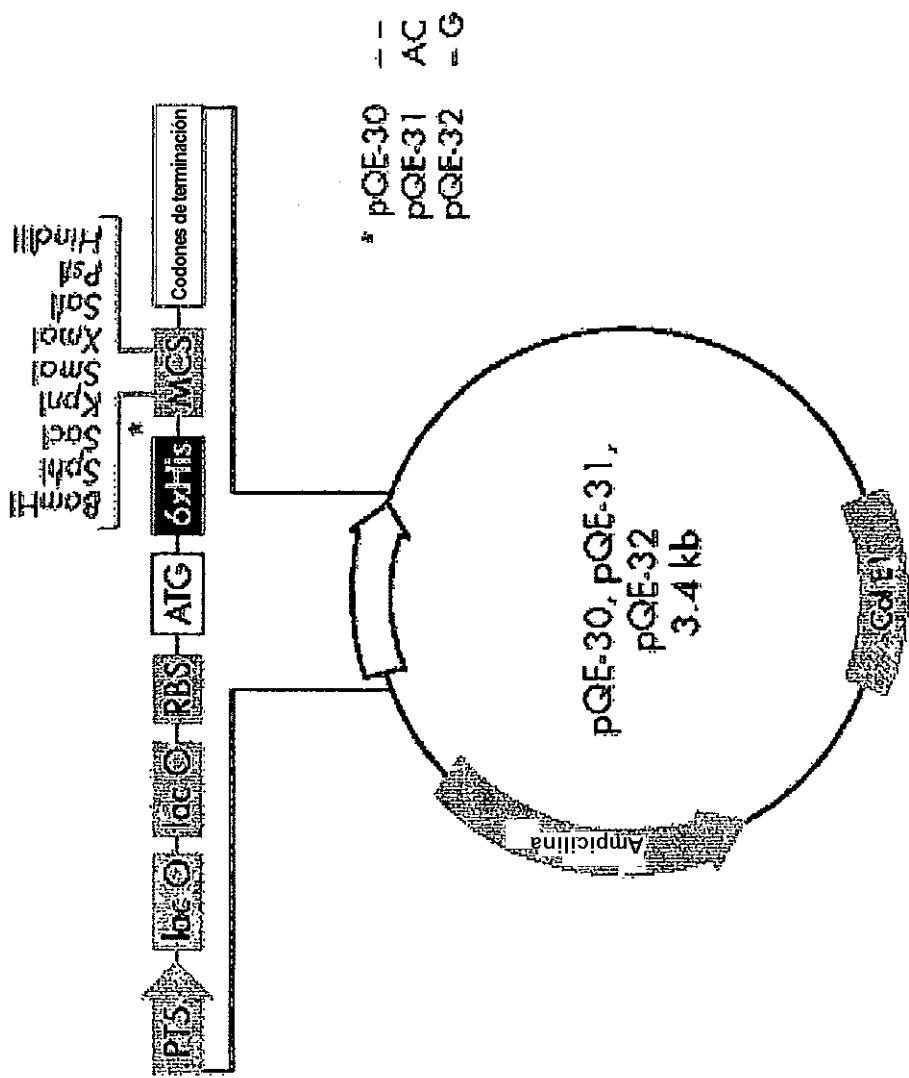


Figura 12

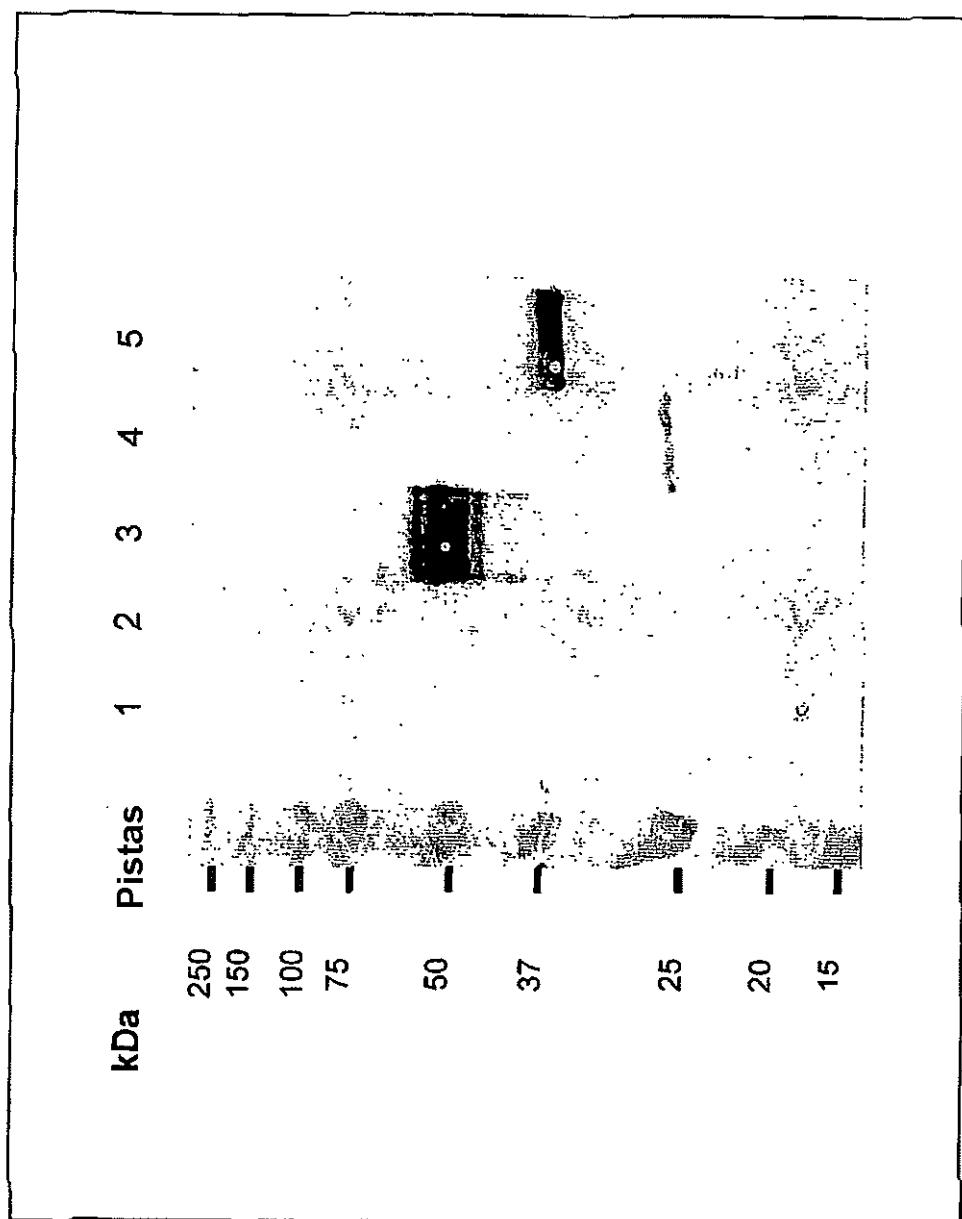


Figura 13

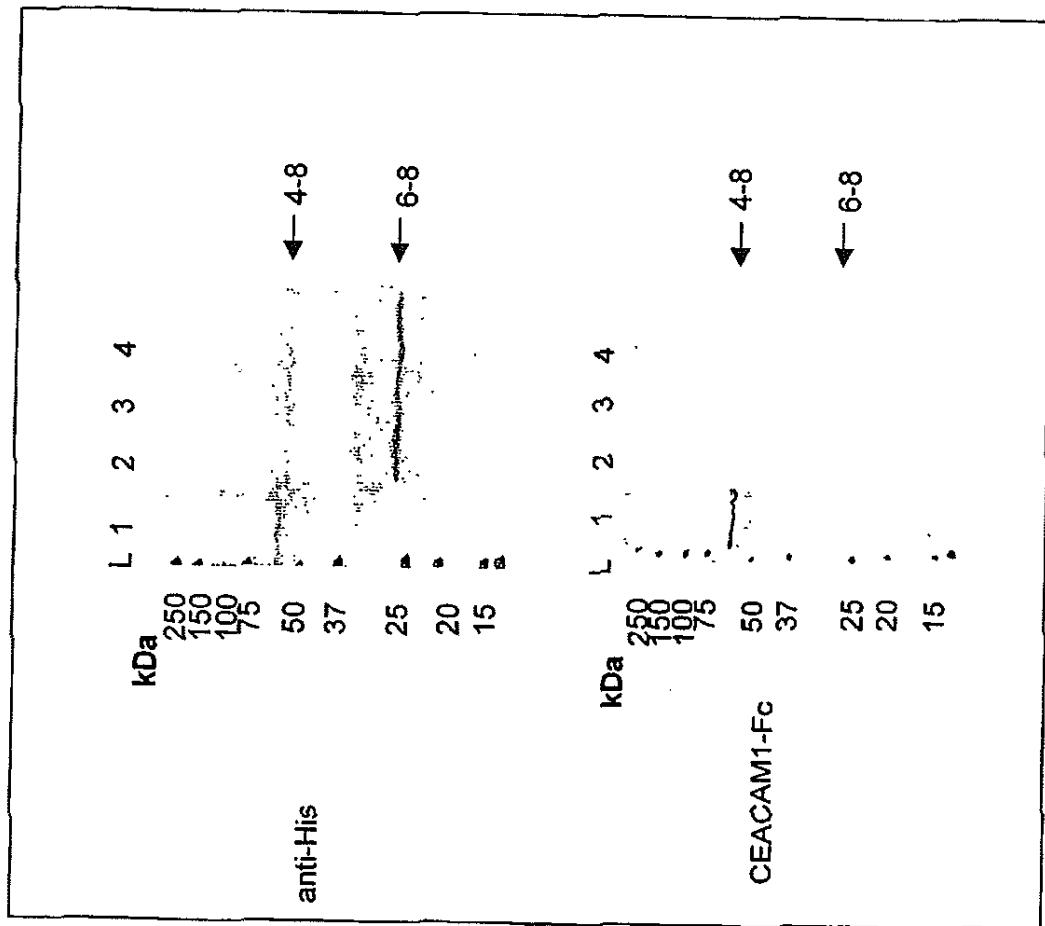


Figura 14

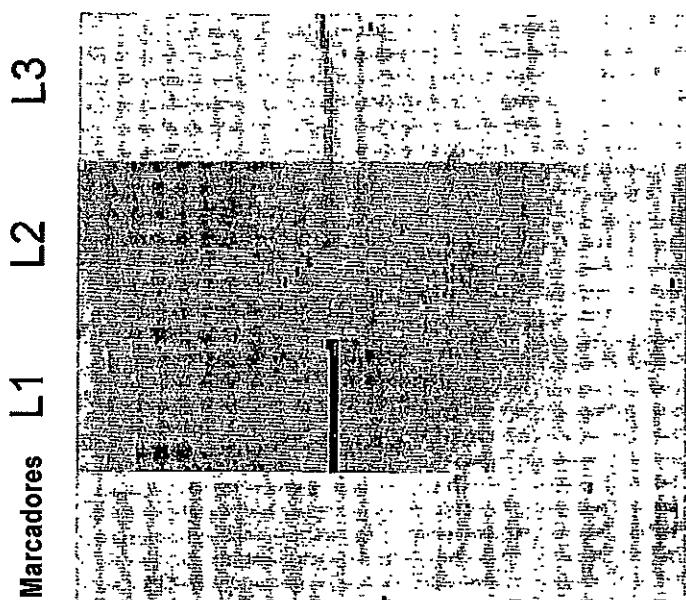
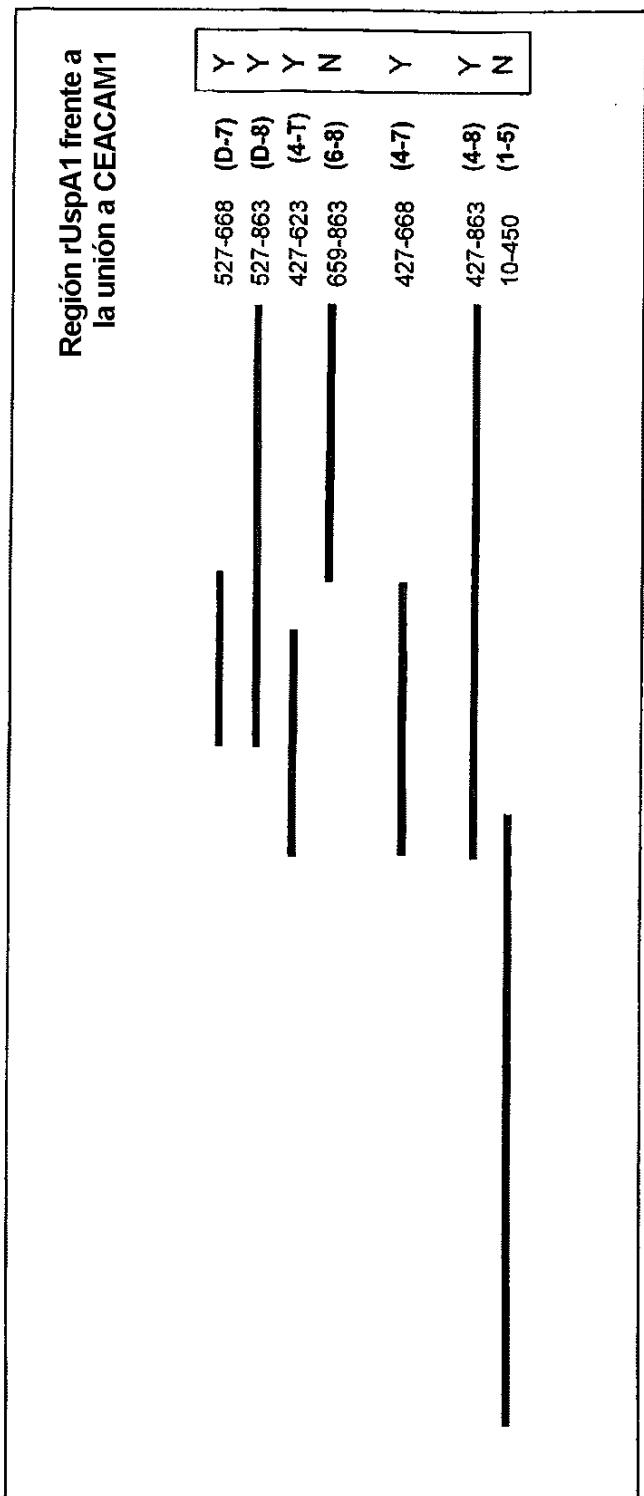


Figura 15

**Fragmentos y pesos moleculares (kDa) previstos**

	D-7	c. 15
D-8		36
4-T		21
6-8		22
4-7		26
4-8		47
1-5		40

para los péptidos recombinantes, sumar alrededor de 2kDa

Figura 16

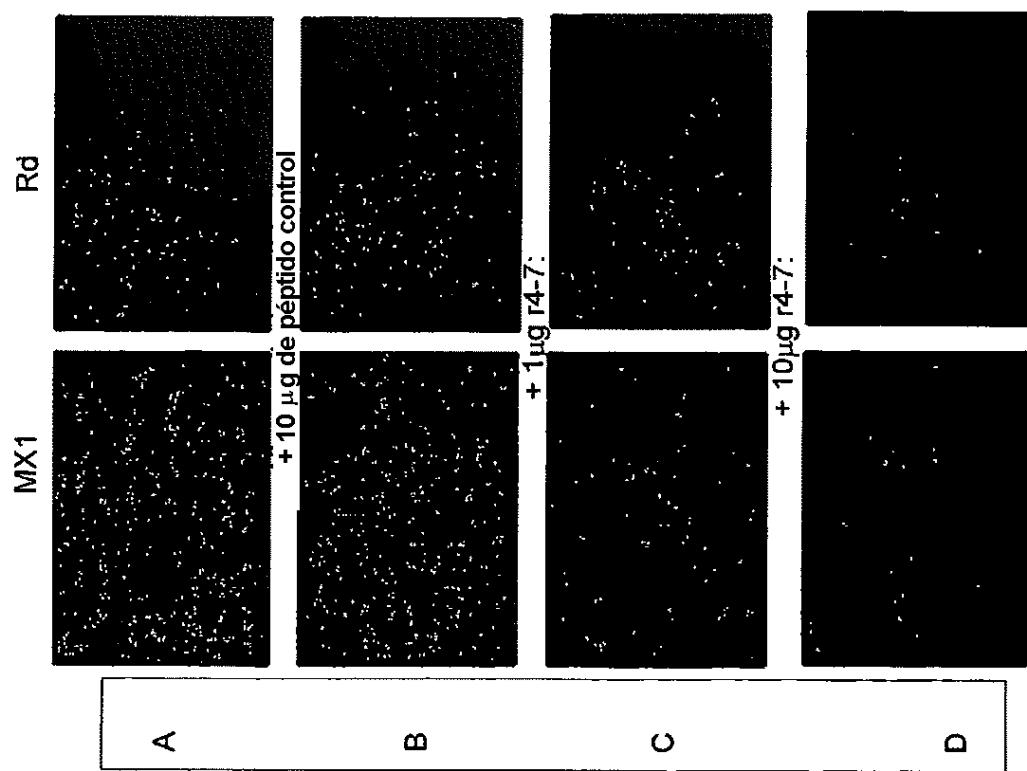


Figura 17