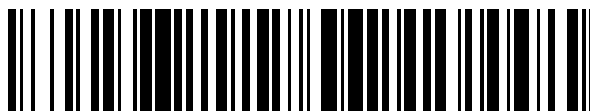


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 933**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/12** (2006.01)

**C07K 16/44** (2006.01)

**A61K 39/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2005 E 05748130 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 1749031**

54 Título: **Uso de un scFv para reducir una biopelícula existente**

30 Prioridad:

**15.05.2004 GB 0410958**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**04.11.2013**

73 Titular/es:

**HAPTOGEN LIMITED (100.0%)  
7 Castle Street  
Edinburgh Scotland EH2 3AH, GB**

72 Inventor/es:

**CHARLTON, KEITH;  
PORTER, ANDREW y  
THORNTHWAITE, LORNA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 427 933 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

Uso de un scFv para reducir una biopelícula existente

**Campos de la invención**

5 La presente invención se refiere a procedimientos para el control y el tratamiento de infecciones bacterianas en pacientes. La invención proporciona la aplicación de las terapias basadas, en la realización preferida, en las moléculas de inmunoglobulina o moléculas receptor de tipo inmunoglobulina que tienen afinidad y especificidad por las moléculas de señalización acil homoserina lactona implicadas en los procesos de la célula bacteriana para la comunicación celular. Al unirse a tales moléculas, los receptores se pueden utilizar para modular las concentraciones extracelulares de moléculas implicadas en la detección del entorno de las bacterias, por ejemplo  
10 *Pseudomonas aeruginosa* y/o otras bacterias patógenas y al hacerlo puede reducir o inhibir la formación de biopelículas y la virulencia y la resistencia asociada de las bacterias de las biopelículas a agentes anti-bacterianos.

**Antecedentes de la invención**

15 Una de las principales causas de mortalidad y morbilidad entre los pacientes sometidos a tratamiento en los hospitales hoy en día es la infección adquirida en hospital. La susceptibilidad a dicha infección puede ser debida a la enfermedad primaria por la que se ingresó al paciente, a los regímenes de tratamiento de inmunosupresores o como consecuencia de una lesión que tiene como resultado daño grave de la piel, tales como quemaduras. La bacteria a la que se atribuye la mayor proporción de casos es *Pseudomonas aeruginosa*. Es el epítome de un patógeno oportunista de los seres humanos. La bacteria casi nunca infecta tejidos no comprometidos, sin embargo, apenas hay tejidos que no puede infectar, si las defensas del tejido están en peligro de alguna manera. Aunque representa  
20 un número relativamente pequeño de especies, supone una seria amenaza para la salud humana y se utiliza de aquí en adelante como un ejemplo representativo de una bacteria infecciosa y no limita de modo alguno el alcance o el ámbito de la presente invención.

*Ps. aeruginosa* es un patógeno oportunista que causa infecciones del tracto urinario, infecciones del sistema respiratorio, dermatitis, infecciones de tejidos blandos, bacteriemia y una variedad de infecciones sistémicas, particularmente en víctimas de quemaduras graves y en cáncer y en pacientes con SIDA que están inmunosuprimidos. Las infecciones respiratorias causadas por *Ps. aeruginosa* ocurren casi exclusivamente en personas con vías respiratorias inferiores comprometidas o con un mecanismo de defensa sistémico comprometido. La neumonía primaria ocurre en los pacientes con enfermedad pulmonar crónica e insuficiencia cardíaca congestiva. La neumonía bacteriémica ocurre comúnmente en pacientes neutropénicos con cáncer sometidos a quimioterapia.  
25 La colonización del tracto respiratorio inferior de pacientes con fibrosis quística por cepas mucoides de *Ps. aeruginosa* es común y difícil, si no imposible, de tratar. Causa bacteriemia principalmente en pacientes inmunocomprometidos. Condiciones predisponentes son neoplasias hematológicas, inmunodeficiencia relacionada con el SIDA, neutropenia, diabetes mellitus y quemaduras graves. En la mayoría de los casos, la bacteriemia por *Pseudomonas* se adquiere en los hospitales y hogares de ancianos donde representa alrededor del 25 por ciento de  
30 todas las bacteriemias nosocomiales gramnegativas.

La bacteria es notoria por su resistencia natural a muchos antibióticos debido a la barrera de permeabilidad proporcionada por su membrana externa de LPS y es, por lo tanto, un patógeno particularmente peligroso y temido. Además, su tendencia a colonizar las superficies en forma de biopelículas hace que las células sean impermeables a concentraciones terapéuticas de antibióticos (Shih y Huang, 2002) y para albergar células fagocíticas (Wozniak et al., 2003). Se cree que la formación de biopelículas desempeña un papel clave en la protección de las bacterias de las defensas del hospedador. Los estudios han revelado que *Ps. aeruginosa* aislada de las heridas es capaz de producir una cápsula de exopolisacáridos a las pocas horas de la infección, una propiedad que es probable que contribuya significativamente a la colonización exitosa (Harrison-Baestra et. al., 2003). Dado que su hábitat natural es el suelo, viviendo en asociación con los bacilos, actinomicetos y hongos, se ha desarrollado resistencia a una  
40 variedad de antibióticos de origen natural. Por otra parte, *Pseudomonas spp.* mantienen plásmidos de resistencia a antibióticos, ambos factores de resistencia (factores R) y factores de transferencia de resistencia (RTF), y son capaces de transferir estos genes por medio de los procesos bacterianos de transducción y conjugación. Sólo unos pocos antibióticos son efectivos contra *Pseudomonas*, incluyendo fluoroquinolona, gentamicina e imipenem, e incluso estos antibióticos no son eficaces contra todas las cepas. Las combinaciones de gentamicina y carbenicilina son supuestamente eficaces en pacientes con infecciones agudas por *Ps. aeruginosa*. La inutilidad de tratar las infecciones por *Pseudomonas* con antibióticos se ilustra más drásticamente en pacientes con fibrosis quística, prácticamente todos los cuales eventualmente se convierten en infectados con una cepa que es tan resistente que no puede ser tratada. Debido a la resistencia a los antibióticos, las pruebas de susceptibilidad de los aislados clínicos son obligatorias.

55 *Ps. aeruginosa* puede ser generalmente aislada del suelo y del agua, así como de las superficies de las plantas y de los animales. Se encuentra en todo el mundo, donde existen estos hábitats, por lo que es una bacteria bastante "cosmopolita". A veces está presente como parte de la flora normal de los seres humanos, aunque la prevalencia de la colonización de individuos sanos fuera del hospital es relativamente baja (las estimaciones varían del 0 al 24 por ciento dependiendo de la localización anatómica). En los hospitales se sabe que coloniza alimentos, fregaderos,

grifos, fregonas, equipo respiratorio y los instrumentos quirúrgicos. Aunque la colonización precede generalmente a las infecciones por *Ps. aeruginosa*, la fuente y el modo de transmisión del patógeno exactos son a menudo poco claros debido a su presencia ubicua en el medio ambiente. Entre los pacientes de cuidados intensivos en los que se sospecha la infección por motivos clínicos, hasta el 50% no tienen ninguna fuente identificable de infección. Actualmente *Ps. aeruginosa* causa cada día 1.400 muertes en el mundo en unidades de cuidados intensivos (UCI), siendo la causa de muerte número 1.

*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 es de un promedio de 0,4 por ciento (4 por cada 1.000 altas) y la bacteria es el cuarto patógeno nosocomial más frecuentemente aislado y que representa el 10,1% de todas las infecciones adquiridas en el hospital. A nivel mundial, es responsable del 16% de los casos de neumonía nosocomial, el 12% de las infecciones urinarias adquiridas, el 8% de las infecciones de la herida quirúrgica y el 10% de las infecciones del torrente sanguíneo. Los pacientes inmunocomprometidos, como los pacientes con cáncer neutropénico y trasplante de médula ósea son susceptibles a infección oportunista por *Ps. aeruginosa*, lo que conduce al a 30% de las muertes registradas. También es responsable de 38% de las neumonías asociadas a ventilación mecánica y del 50% de las muertes entre los pacientes con SIDA. En el caso de las quemaduras, las infecciones por *Ps. aeruginosa* han disminuido en los últimos años debido a la mejora del tratamiento y a cambios en la dieta. Sin embargo las tasas de mortalidad siguen siendo elevadas, lo que representa un 60% de todas las muertes por infección secundaria de pacientes quemados.

Una de las razones de la versatilidad de *Ps. aeruginosa* es que produce una batería diversa de determinantes de virulencia, incluyendo elastasa, LasA proteasa, proteasa alcalina, ramnolípido, 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 bien caracterizados, concretamente los sistemas *las* y *rhl* (*vsm*) que comprenden los homólogos de LuxRI LasRI (Gambello & Iglewski, 1991) y RHIRI (VsmRI) (Latif y col., 1995) respectivamente. LasI dirige la síntesis de 3-oxo-C12-HSL (Passador y col., 1993, Pearson y col., 1994), mientras que RHII dirige la síntesis de C4-HSL (Winson y col., 1995). Se cree que los sistemas *las* y *rhl* existen en una jerarquía en la que el sistema *las* ejerce el control transcripcional sobre RHIR (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 la mucosa del pulmón. En combinación con proteasa alcalina también provoca inactivación del interferón gamma (INF) y del factor de necrosis tumoral (FNT). 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 RHIR, junto con su AHL afín (C4-HSL), regula la expresión de *rhlAB* (ramnolípido), *lasB*, *aprA*, RpoS, cianuro, piocianina y las lectinas PA-I y PA-II (Ochsner y col., 1994, Brint & Ohman, 1995, 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.

Uno de los trastornos clínicos más graves inducidos por *Ps. aeruginosa* es la infección pulmonar crónica destructiva de los pacientes con fibrosis quística (FQ). Casi todos los pulmones de los pacientes están infectados a la edad de tres años (Bums y col., 2001). Los sistemas inmunitarios de los pacientes con FQ son incapaces de eliminar las bacterias, lo que tiene como resultado la aparición de la enfermedad crónica con el daño tisular extenso asociado y el bloqueo de las vías respiratorias a la que la mayoría de los pacientes finalmente sucumben. El establecimiento y la persistencia de la infección pulmonar por *Ps. aeruginosa* se ha asociado hace tiempo con el desarrollo de un fenotipo de biopelícula, además de la inducción de otros factores de virulencia regulados de sensibilidad de quórum (Singh y col., 2000). Las señales de sensibilidad de quórum se detectan fácilmente en los pulmones con FQ de los ratones infectados (Wu y col., 2000). Entre otros efectos, la producción de las moléculas de señalización AHL bien caracterizados por *Ps. aeruginosa* en el pulmón puede afectar directamente a las respuestas inmunitarias del hospedador mediante la modulación de la relación de isotipo entre la respuesta de anticuerpos y las concentraciones de citoquinas (Wu y col., 2004). Por otra parte, el crecimiento de *Ps. aeruginosa* en biopelículas tiene como resultado densidades celulares muy altas, del orden de  $1 \times 10^{10}$  células/ml, una mayor proximidad física de las células, proporcionando el ambiente perfecto para una mayor comunicación de célula a célula mediante la sensibilidad de quórum y la producción asociada de los factores de virulencia.

Se investigan activamente varios enfoques diferentes para desarrollar agentes terapéuticos para el tratamiento o prevención de la infección por *Ps. aeruginosa*. Algunos pretenden ser 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 gramnegativas en general, aunque 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 inhibe simultáneamente la producción de hemaglutininas, hemolisina, proteasas y homoserina lactonas (HSL) de *Ps. Aeruginosa* y puede ser aplicable para el tratamiento de la infección persistente por *Ps. aeruginosa*. Las formulaciones de crema que contienen péptidos anfipáticos también se están examinando como un posible medio para evitar la 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 la infección.

También existe cierto interés en la modulación de los niveles de homoserina lactona como un medio para controlar la patogenicidad. Se ha demostrado que ciertas algas producen inhibidores competitivos de acil-homoserina lactonas (AHL) tales como furanonas (Manefield, 1999), así como algunas plantas terrestres. Estos compuestos desplazan la molécula de 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 y el secuestro de AHL por anticuerpos (WO 2004/014423). También se ha incrementado la investigación de imitadores de AHL que compiten con AHL naturales por la unión del receptor de la bacteria, pero que no provocan respuestas reguladas por sensibilidad de quórum, como la formación de biopelículas y la virulencia (Suga y Smith, 2003).

Existen varios problemas potenciales y limitaciones asociadas 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 extensa durante el crecimiento de la biopelícula que protege eficazmente contra la opsonización por anticuerpos del hospedador, como se reveló por pacientes con infecciones persistentes que tenían altas titulaciones en suero de anticuerpos *anti-Pseudomonas*. Esto también proporciona a la bacteria una protección significativa contra los antibióticos y otras sustancias químicas antimicrobianas. Se ha demostrado que los aislados clínicos de *Ps. aeruginosa* son resistentes a concentraciones elevadas de antibióticos cuando crecen como una biopelícula y que los mutantes defectuosos en sensibilidad de quórum producen polisacáridos menos desarrollados o insignificantes y se destruyen con concentraciones mucho más bajas de antibióticos (Shih y Huang, 2002). El uso de miméticos auto-inductores está limitado por las concentraciones de la mayoría de los que se requieren para competir eficazmente contra HSL por el sitio de unión al receptor y la posibilidad de efectos secundarios. Se sabe 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 la 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 inmunitario 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 y debido a la resiliencia general a sustancias antimicrobianas proporcionada por el fenotipo de la biopelícula.

Que la patogénesis de la *Ps. aeruginosa* es claramente multifactorial está subrayada por el gran número de factores de virulencia y el amplio espectro de enfermedades asociadas con esta bacteria. Muchos de los factores de virulencia extra-celulares requeridos para la invasión y la difusión en el tejido y la formación de biopelículas, están controlados por los sistemas de señalización de célula a célula que implican moléculas señal basadas en homoserina lactona y proteínas activadoras de la transcripción específicas. Estos sistemas de regulación permiten a *Ps. aeruginosa* adaptarse a una forma virulenta en una manera dependiente de la densidad celular coordinada y superar los mecanismos de defensa del hospedador.

Existe la necesidad de desarrollar medios eficaces de modulación de las concentraciones de HSLs y otras moléculas de señalización de células bacterianas implicadas en la patogenicidad por procedimientos que no tengan efectos secundarios adversos y que sea poco probable que sean eludidos por bacterias patógenas en el futuro previsible. Una composición o compuesto capaz de prevenir la formación de biopelículas en las bacterias, en particular de *Pseudomonas aeruginosa*, que no ataque directamente a la célula bacteriana y, por lo tanto, que sea poco probable que conduzca a cepas resistentes sería muy beneficiosa para el tratamiento de estados patológicos, tales como FQ y la prevención de la infección de la herida. En particular, esto aumentaría la eficacia de muchos tratamientos anti-microbianos existentes y podría hacer que muchos de los que ya no se consideran viables fuesen eficaces de nuevo. La presente invención proporciona tales composiciones.

La solicitud de patente de EE.UU. publicada como US 2003/0095985 describe conjugados inmunogénicos de moléculas autoinductoras bacterianas gramnegativas y anticuerpos producidos contra estas moléculas.

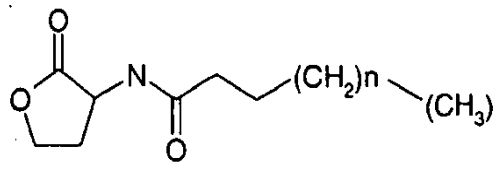
Además, la patente de EE.UU. nº 6.703.513 describe la producción y el uso de homoserina lactonas derivadas y anticuerpos contra esas moléculas.

**Resumen de la invención**

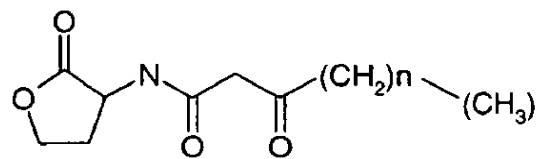
5 La presente invención proporciona procedimientos para reducir el número de las bacterias patógenas mediante la regulación de las concentraciones extracelulares de moléculas de señalización celular bacteriana. Mediante la eliminación (unión o degradación) de moléculas de señal de células derivadas de lactona, podría inhibirse el establecimiento de biopelículas y el crecimiento similar a biopelículas, aumentando de esta manera la sensibilidad de los patógenos a los medicamentos anti-microbianos y a los mecanismos de defensa del hospedador. Mientras que otros tratamientos bactericidas actúan directamente sobre la célula para causar la muerte, la presente invención se dirige a moléculas de señalización extracelulares con el fin de reducir la formación de biopelículas. Como tal, es mucho menos probable que surjan cepas resistentes a la terapia.

10 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo contra la forma libre de una molécula de señal homoserina lactona secretada por las bacterias para su uso en la disminución de una biopelícula establecida producida por una población de bacterias, en el que el anticuerpo es el anticuerpo de cadena única (scAb) G3B12 depositado como NCIMB - 41168.

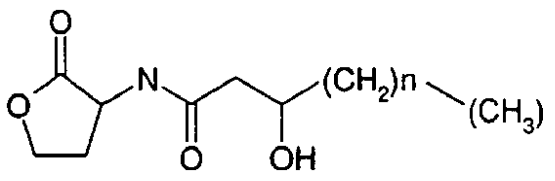
15 La molécula de señal de lactona puede ser una molécula homoserina o una molécula de péptido tiolactona. La molécula de homoserina lactona puede tener una fórmula general seleccionada del grupo que consiste en:



Fórmula I



Fórmula II



Fórmula III

20

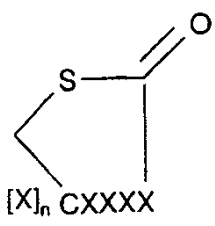
en las que n = 0 a 12.

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

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

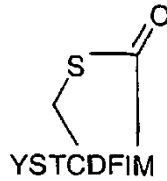
La molécula de homoserina lactona de fórmula general III puede ser N-(-3-hidroxi-butanoil)-L-homoserina lactona (HBHL) en la que n = 0.

30 El péptido tiolactona puede tener una fórmula general (IV) siguiente:

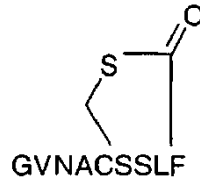


en la que X es cualquier aminoácido y n = 1 a 10.

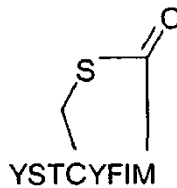
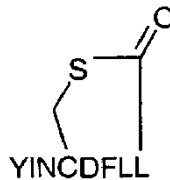
Adecuadamente, la molécula tiolactona peptídica puede ser:



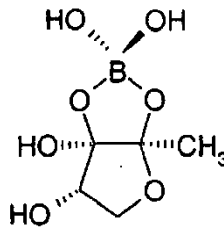
o



5

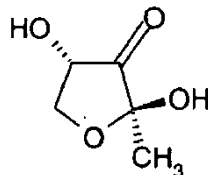


La molécula de señal derivada de lactona también puede ser un borato diéster de furanosilo. El borato diéster de furanosilo puede ser el autoinductor-2 (IA-2),



10

La molécula de señal lactona derivada también puede ser Pro-AI-2 o un ácido carboxílico saturado o insaturado C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> del mismo.



15 Un número creciente de especies bacterianas se han encontrado que se comunican entre células usando una diversidad de moléculas señal pequeñas. Las bacterias gramnegativas usan predominantemente N-acil homoserina lactonas. 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. 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. *Pseudomonas aeruginosa* utiliza varias y en particular N-butilil-homoserina lactona (BHL), 3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona (OdDHL) y N-hexanoil-homoserina lactona (HHL).

20

Las células utilizan las moléculas como un medio para determinar la densidad celular local, de tal manera que en condiciones de baja densidad celular, la concentración de la molécula de señal es correspondientemente baja. En altas densidades de células, la concentración de la molécula de señal local es alta. Cuando esta concentración alcanza un nivel umbral, induce la transcripción de los genes implicados en la virulencia y la aparición de un estado patológico en el hospedador. Muchas bacterias patógenas incluyendo *Ps. aeruginosa* son capaces de crecer como biopelícula. En tales condiciones, las células están encerradas en una matriz de exopolisacáridos. Esto proporciona tanto una barrera física contra los agentes anti-microbianos como resistencia a la fagocitosis, aunque tiene como resultado una alta densidad celular local que conduce al interruptor inducido por la sensibilidad de quórum de las bacterias oportunistas a un fenotipo patógeno.

Muchas bacterias móviles emplean un sistema de quimiotaxis mediante el cual las células son capaces no sólo de detectar la presencia de una variedad de compuestos del medio ambiente, sino también controlar los gradientes de concentración de estos y ajustar el comportamiento de natación en consecuencia. Por lo tanto, las bacterias tenderán a moverse hacia estímulos tales como nutrientes y a alejarse de estímulos que representan condiciones desfavorables. Ahora se sabe que algunas bacterias, incluyendo *Ps. aeruginosa* exhiben una respuesta quimiotáctica positiva a moléculas de señalización celular, tales como AHL (véanse los Ejemplos, la figura. 4). Este comportamiento podría ser importante en el establecimiento y desarrollo de trastornos patológicos, ya que las bacterias tenderían a moverse hacia las demás y hacia una mayor concentración de moléculas señal. Esto llevaría a un aumento en la densidad de área local y al establecimiento prematuro de la biopelícula protectora, un aumento de los niveles locales de las concentraciones de moléculas señal extracelulares y una reducción concomitante en el tiempo para el cambio a un fenotipo patógeno. Los anticuerpos de la presente invención y divulgación, por lo tanto, se pueden aplicar para bloquear la respuesta quimiotáctica de las bacterias a sus moléculas señal propias y de otras especies.

Moléculas de señalización bacteriana se están descubriendo 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 gramnegativas (gram -) usan moléculas basadas en homoserina lactona y las bacterias grampositivas (gram +) usan péptidos pequeños (modificados). El trabajo previo en este campo se ha centrado en imitar las moléculas señal con las que son reconocidos, pero que no funcionan, es decir, sin cambio patogénico (Suga y Smith, 2003) o en el bloqueo de los distintos sistemas receptores. Las desventajas de estos procedimientos son, principalmente, que la resistencia que se puede desarrollar para imitar o bloquear la molécula de señal "real" sigue presente y competirá por la unión. Además, los miméticos de la molécula de señal deben entrar primero en contacto con las bacterias y unirse a los receptores de la célula. Además, algunas moléculas de señalización bacterianas, por ejemplo las acil-homoserina lactonas son factores de virulencia por propio derecho y pueden causar directamente inmunosupresión del hospedador (es decir, paciente). La presente invención proporciona procedimientos que utilizan anticuerpos que se dirigen a la molécula de señal real en el entorno extracelular en lugar de la propia célula. Este enfoque tiene una ventaja fundamental e importante sobre todos los esfuerzos anteriores en el campo en que las bacterias no reconocerán que están siendo atacadas, simplemente se detecta que están solas. No habrá ninguna presión selectiva para la resistencia. Los procedimientos de la presente invención son ventajosos, además, porque proporcionan un medio para inhibir la formación de biopelículas y, como tal, aumentan la eficacia de los agentes anti-microbianos existentes, tales como antibióticos, para los que la resistencia emergente se está convirtiendo en un problema mundial grave.

En la presente divulgación, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal. Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de cadena única (scAb) o un fragmento de anticuerpo. El fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo de cadena única (scAb) o un dominio de fragmento único. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o el anticuerpo puede ser una construcción de un anticuerpo humanizado.

En ciertas formas de realización divulgadas, los anticuerpos pueden ser anticuerpos de cadena sencilla (scAbs), tales como G3H5, G3B12, G3G2 y/o G3H3 depositados como NCIMB-41167, NCIMB-41168, NCIMB-41169, NCIMB-41170, respectivamente. El anticuerpo G3B12 también es referenciado como Hap 2 y el anticuerpo G3G2 también es referenciado como Hap 5.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales. Los anticuerpos policlonales pueden inducirse estimulando su producción en un hospedador 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)).

Actualmente existen en la materia técnicas bien desarrolladas para producir anticuerpos monoclonales y policlonales que se unen a una proteína particular. Se analizan en libros de texto de inmunología convencionales, por ejemplo, por Roitt y col, Immunology segunda edición (1989), Churchill Livingstone, Londres.

Además de anticuerpos completos, la presente divulgación incluye derivados de los mismos que son capaces de unirse a antígeno. Por lo tanto la presente divulgación incluye fragmentos de anticuerpo y construcciones sintéticas. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo y construcciones sintéticas se proporcionan en Dougall y col en Tibtech 12 372-379 (septiembre de 1994). Los fragmentos de anticuerpos 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 conector peptídico que une covalentemente las 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.

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 interaccionan 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.

Para generar anticuerpos anti moléculas señal bacterianas, es preferible conjugar la molécula diana, o un derivado adecuado, con dos moléculas vehículo diferentes (proteínas). Las moléculas señal bacterianas, en general, son demasiado pequeñas para estimular una respuesta inmunitaria *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 referenciada como "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. Cualquier otro sistema que permita la selección de los receptores específicos de una biblioteca de receptores también es aplicable para los procedimientos de la presente invención y la divulgación. En formas de realización alternativas, 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.

Un conjugado que comprende un 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 "inmuntubo" o placa de microtitulación y la superficie no revestida se bloquea con un agente de bloqueo no específico, tal como leche en polvo. Las moléculas de conjugado adecuadas pueden incluir, pero sin limitación, proteínas tales como seroalbúmina bovina (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 inmunitaria.

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 el 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 hospedador 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).

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 disocian del conjugado inmovilizado. Los fagos eluidos con antígeno libre se usan para infectar células de *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.

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.

5 En la realización preferida de la invención y divulgación, se generarán anticuerpos a partir de una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpo humano virgen (McCafferty y col. y como se describe en el documento WO 92/01047). Así, los anticuerpos se pueden utilizar para administrar a los pacientes sin producir una respuesta inmunitaria. En otras realizaciones, puede construirse una biblioteca a partir de un animal pre-inmunizado con uno o más conjugados de una HSL y una molécula vehículo adecuada. Otra alternativa es la generación de 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 los anticuerpos resultantes, por ejemplo creando anticuerpos quiméricos de animal hospedador-humano, o "humanización" por injerto de CDR en un armazón marco de anticuerpo adecuado. Otros procedimientos aplicables incluirán la identificación de epítomos 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. El uso de anticuerpos de isotipo IgA secretores puede ser preferible cuando se contemple la administración intra-nasal/aerosol, por ejemplo, en el tratamiento de las infecciones por *Ps. aeruginosa* de los pacientes con fibrosis quística.

Para la presente divulgación, el anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Los anticuerpos pueden ser humanos o humanizados. 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 inhibición o prevención de la formación de biopelículas por bacterias.

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.

Las bacterias pueden ser una especie de bacterias gramnegativas o una especie de bacterias grampositivas. Las bacterias se pueden seleccionar del grupo que consiste en *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Acinetobacter baumannii*, *Bordetella pertussis*, *Brucella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Capnocytophaga sp.*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Kingella kingae*, *Legionella pneumophila*, *Pasteurella multocida*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus sp.*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*, *Veillonella sp.*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides sp.*, *Prevotella sp.*, *Fusobacterium sp.*, *Spirillum minus*, *Aeromonas sp.*, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Acinetobacter sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Xanthomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp* y *Streptococcus spp.*

Los procedimientos y usos de este aspecto de la invención pueden comprender además la administración de un antibiótico. El antibiótico puede ser un antibiótico β-lactámico, tal como una penicilina o un derivado de la penicilina, kanamicina, ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, fluoroquinolona, gentamicina, imipenem y/o carbenicilina, o combinaciones de los mismos.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona también un procedimiento para la prevención o inhibición de la formación de una biopelícula por una población de bacterias en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la administración de un anticuerpo como se ha definido anteriormente en relación con el uso de un primer aspecto de la invención.

Tales procedimientos pueden comprender además la administración de un antibiótico. La administración del antibiótico puede ser al mismo tiempo que la administración del anticuerpo, o puede ser antes de, o después de dicha administración de dicho anticuerpo. Los procedimientos son igualmente aplicables a la medicina humana o veterinaria.

60

Las realizaciones de acuerdo con este aspecto también se extienden al uso de un anticuerpo como se define anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para la prevención o inhibición de la formación de una biopelícula por una población de bacterias.

5 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un kit de partes que comprende un anticuerpo tal como se define anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención y un antibiótico para la administración separada, simultánea o posterior para la disminución de una biopelícula establecida producida por una población de bacterias. Adecuadamente, tales kits contendrán instrucciones de uso en la presente invención.

10 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona el uso de un anticuerpo como se ha definido anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para disminuir una biopelícula establecida producida por una población de bacterias.

15 De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento ex vivo de disminución de una biopelícula establecida formado por una población de bacterias, comprendiendo dicho procedimiento la administración a la población de bacterias de un anticuerpo a la forma libre de una molécula de señal homoserina lactona secretada por las bacterias, en el que el anticuerpo es el anticuerpo de cadena única (scAb) G3B12 depositado como NCIMB - 41168.

De acuerdo con la divulgación, se proporciona tal como se define en este documento un anticuerpo contra una lactona o molécula de señal derivada de lactona secretada por las bacterias para su uso en la prevención o inhibición de la formación de una biopelícula por una población de bacterias.

20 Los procedimientos y usos de acuerdo con la presente invención pueden implicar la formulación de los anticuerpos descritos en este documento, y opcionalmente otras sustancias farmacéuticamente activas, tales como antibióticos, como composiciones farmacéuticas. Tales composiciones se pueden preparar por cualquier procedimiento conocido en la técnica de la farmacia, por ejemplo mezclando el principio activo con un vehículo(s), diluyente(s) o excipiente(s) en condiciones estériles.

25 El anticuerpo puede suministrarse 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).

30 La composición farmacéutica puede ser adaptada 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). Dichas 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).

35 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. 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).

45 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 formulan 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 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.

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

5 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración nasal en las que el vehículo es un sólido incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partículas, 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.

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

15 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 prepararse soluciones y suspensiones de inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

20 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.

30 Los anticuerpos (o equivalente) de la presente invención y la divulgación se podrían administrar para tratar la infección bacteriana, o utilizarse como una medida preventiva para las personas con alto riesgo de infección. En el caso en el que ya existe infección, los anticuerpos se pueden administrar solos o en combinación con anticuerpos o antibióticos antibacterianos u otros tratamientos antimicrobianos. La administración de dichos anticuerpos en combinación con otras terapias puede permitir el uso de cursos cortos o dosis más bajas del tratamiento, disminuyendo así el riesgo de que surja resistencia y mejorar el cumplimiento del paciente.

35 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.

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. El tratamiento puede ser profiláctico o puede ser con respecto a una afección existente. El tratamiento también puede ser utilizado para mejorar la eficacia de los tratamientos existentes.

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

45 Los procedimientos y usos de la invención pueden aplicarse a una dolencia/enfermedad aguda o crónica a corto o largo plazo causada por bacterias. En una realización preferida, los procedimientos y usos de la invención pueden dirigirse contra una infección causada por el patógeno *Pseudomonas aeruginosa* que es de particular preocupación con los pacientes que sufren de fibrosis quística. Además, como los procedimientos y usos 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.

50 El anticuerpo puede administrarse a pacientes infectados para modular y reducir la infección bacteriana reduciendo la formación de biopelícula. Esto puede incluir la inhalación del anticuerpo en un aerosol por pacientes con fibrosis quística para aumentar la esperanza de vida o la administración tópica a las heridas.

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

5 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 el fin de reducir la formación de biopelículas entre los microorganismos infectantes, reduciendo así la virulencia y haciendo que las bacterias tengan una mayor susceptibilidad a agentes bactericidas y a los mecanismos de defensa del hospedador. Esto puede conseguirse con otros receptores naturales (como anticuerpos o fragmentos de los mismos) o moléculas basadas en receptores naturales que se unen a dichas moléculas señal lactona. 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).

10 En otra realización más, el receptor puede tener actividad catalítica o enzimática y ser capaz de convertir la molécula de señalización celular lactona a una forma que ya no se reconoce por el organismo diana.

15 De acuerdo con la divulgación, se proporciona también un anticuerpo tal como se define en la presente memoria para su uso en la inhibición o la prevención de las respuestas quimiotácticas de las bacterias a las moléculas de señalización celular. Tales usos se extienden a procedimientos para inhibir o prevenir las respuestas quimiotácticas de las bacterias a las moléculas de señalización celular, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar una composición que comprende un anticuerpo tal como se define en la presente memoria a dicha población de bacterias.

Las características preferidas del segundo y subsiguientes aspectos de la invención son como para el primer aspecto *mutatis mutandis*.

20 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención, incluyendo pero sin limitarse a las aplicaciones relacionadas en hospedadores animales, serán evidentes para los expertos en la técnica después de la revisión de la memoria descriptiva y las reivindicaciones de la invención.

25 Resultará evidente para los expertos en la materia que las composiciones y procedimientos divulgados en la presente memoria pueden tener aplicación a lo largo de una amplia serie de organismos en la inhibición de la formación de biopelículas y en la modulación o tratamiento de trastornos resultantes de la 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 de la presente memoria a otras especies.

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

### 30 Descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra el efecto sobre el desarrollo del crecimiento de biopelícula de *Ps. aeruginosa* PA14 de diferentes concentraciones del fragmento de anticuerpo de cadena única anti-AHL (scAb) Hap-2 (•) en comparación con los controles en los que no había presente anticuerpo (□) ni células bacterianas (O) presentes.

35 La Figura 2 muestra los efectos de scAb Hap-2 (•), tetraciclina (▼), Hap-2 + tetraciclina (O) en la formación de biopelícula a las 6 horas en comparación con los controles con las bacterias sólo (■) y sólo PBS (□).

La Figura 3 muestra la evolución temporal para la inhibición de la biopelícula por Hap-2 (□) en comparación con ningún anticuerpo (□), anticuerpo solo (□) y sin bacterias (□) controles.

40 La Figura 4 muestra el movimiento de *Ps. aeruginosa* móviles frente a diferentes concentraciones de la molécula señal de sensibilidad de quórum hexanoil homoserinlactona (HHL).

### Ejemplo 1: Generación de anticuerpos anti-AHL

Se hizo un cribado de una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpos humanos vírgenes contra conjugados de la acil-homoserina lactona dDHL (dodecanoilo homoserinlactona). Brevemente, un derivado de dDHL incluyendo un grupo carboxilo en el extremo de la cadena de acilo se conjugó con las proteínas portadoras de seroalbúmina bovina (BSA) y tiroglobulina bovina (TG) utilizando la química bien conocida. La biblioteca de anticuerpos se cribó (emparejó) contra cada conjugado alternativamente durante tres rondas con los fagos que se unen al conjugado que se quiere aislar, amplificar y usar para la siguiente ronda. Después de la primera ronda, se recuperaron todos los fagos de unión y se amplificaron. Durante la segunda y tercera rondas, los fagos unidos se eluyeron a partir del conjugado inmovilizado por incubación con una solución de dDHL libre nativa soluble. Anticuerpos monoclonales de fagos de la tercera ronda fueron seleccionados inicialmente para la unión a ambos conjugados AHL y a la proteína portadora sola. Esos clones de unión sólo al antígeno conjugado se cribaron adicionalmente para detectar la capacidad de unirse a la dDHL libre por ELISA de unión competitiva. Se aisló un clon designado Hap 2 que podría ser inhibido en la unión al conjugado de dDHL en presencia de dDHL libre o BHL libre (N-butil-homoserina lactona).

Determinación de la producción de biopelícula

La formación de biopelículas por *Pseudomonas aeruginosa* se midió mediante la evaluación de la capacidad de las células en crecimiento por adherirse a la superficie de placas de microtitulación de 96 pocillos de polipropileno de acuerdo con los procedimientos descritos por Conway et al., 2002. La cepa PA14 de *Ps. aeruginosa* se inoculó en 5 ml de caldo LB y se incubó durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, las bacterias se inocularon en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos que contenía 100 µl/pocillo de caldo LB y se incubó durante la noche en un ambiente humidificado a 37 °C. El uso de un medio mínimo (LB) previene la formación de biopelículas.

La placa se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min y el sobrenadante se aspiró con cuidado de no alterar las células sedimentadas. Las células se resuspendieron luego in situ con 100 µl/pocillo de caldo de infusión de cerebro/corazón. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 2 h. Se eliminó el medio y los pocillos se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de dH<sub>2</sub>O para eliminar las células del fondo restantes, teniendo cuidado de no alterar ninguna biopelícula que se hubiera desarrollado. Las células adheridas (biopelícula) se tiñeron por adición de 125 µl/pocillo de una solución al 1% de cristal violeta seguido de incubación a temperatura ambiente durante 15 min. El exceso de tinte se eliminó a continuación por lavado a fondo de la placa de fondo con dH<sub>2</sub>O. La tinción de cristal violeta, que es una medida de la extensión de la biopelícula producida, se recuperó con 200 µl/pocillo de etanol al 95%. La absorbancia de 125 µl de etanol/violeta cristal se midió a 590 nm.

Inhibición de las biopelículas

Se llevaron a cabo ensayos de biopelículas como se describió anteriormente. Cuando las bacterias sedimentadas se resuspendieron en el caldo de infusión cerebro/corazón, se añadieron otros 100 µl/pocillo de fragmento de anticuerpo de una sola cadena Hap 2 (scAb) en PBS o PBS solo.

i) Titulación de la inhibición de biopelículas

Se estableció una serie de dilución de scAb anti-AHL Hap-2 en pocillos duplicados para determinar el efecto de la concentración de anticuerpos en el establecimiento de una biopelícula por *Ps. aeruginosa* PA14. Se continuó la incubación como se ha descrito anteriormente durante 2 h y el efecto de la adición de Hap 2 sobre la formación de biopelículas se determinó por la cantidad de tinción de cristal violeta fijado a diversas concentraciones de scAb. Los experimentos de control se llevaron a cabo sustituyendo scAb por PBS, o también se omitieron las bacterias para evaluar la cantidad de mancha adsorbida pasivamente sobre las placas. Los resultados demuestran claramente que la adición de la scAb Hap-2 causa una inhibición dependiente de la concentración de las biopelículas (Figura 1). Una concentración de scAb 70 nM es suficiente para reducir la biopelícula en aproximadamente un 80%.

ii) El efecto de los anticuerpos y la tetraciclina.

Se sabe que el antibiótico tetraciclina inhibe la formación de biopelículas entre las *Pseudomonas* sp. El ensayo de biopelícula se llevó a cabo esencialmente como se describe anteriormente, sin embargo el tiempo de incubación para los cultivos en presencia de inhibidores de la biopelícula se extendió a 6 horas. Además de una serie de dilución de scAb, los pocillos por duplicado también fueron tratados con una serie de diluciones de tetraciclina. Otra serie de pocillos incluía tanto scAb como tetraciclina. Los resultados indican que aunque tanto scAb como la tetraciclina son efectivos para reducir la formación de biopelículas durante un período prolongado, la combinación de los dos proporciona un efecto aditivo a bajas concentraciones (Figura 2).

iii) Evolución temporal de la inhibición de biopelículas.

El efecto de la adición de scAb a la formación de biopelículas a lo largo del tiempo se evaluó mediante la realización del ensayo durante un período de 4 horas y tomando lecturas de las muestras en varios puntos temporales. La concentración de scAb anti-AHL Hap-2 a 70 nM se comparó con cultivos en los cuales scAb no estaba presente y los efectos de scAb y PBS solo sobre la adsorción de cristal violeta incluidos como controles (Figura 3). Los resultados sugieren que las células bacterianas se adhieren muy rápidamente a las superficies cuando se cultivan en medios ricos y que Hap-2 disminuye progresivamente la biopelícula establecida rápidamente con el tiempo.

**Ejemplo 2: Establecimiento de una asociación entre la sensibilidad de quórum y la quimiotaxis.**

Se llevó a cabo un ensayo para determinar si *Ps. aeruginosa* es capaz o no de responder a la presencia de moléculas de señalización celular AHL mediante la alteración de su fenotipo, pero también si es capaz de buscar activamente bacterias compañeras mediante la detección de dirección de las moléculas de AHL y el movimiento hacia la fuente.

Se cortaron cuatro pocillos en placas de agar LB cerca del borde de las placas y radialmente a 90° el uno del otro usando un taladro de núcleo. Se añadieron a cada uno de los tres pocillos, cien microlitros de HHL (hexanoil homoserina lactona) a diversas concentraciones. Se añadió PBS al cuarto como control. Se sembraron veinte microlitros de inóculo al 1% de un cultivo de una noche de *Ps. aeruginosa* PA14 en el centro de las placas, equidistantes de cada uno de los pocillos y las placas se incubaron durante la noche a 37 °C.

Además del punto central donde se aplicaron las bacterias a la placa, se observaron un número de colonias a diferentes distancias del centro. Estas se desarrollaron a partir de células móviles que habían migrado a través de la superficie de agar antes de asentarse y crecer de una manera sésil. Las placas fueron marcadas en cuatro cuadrantes iguales, de tal manera que cada pocillo era equidistante de cada cuadrante adyacente. Se contaron los números de colonias situadas en cada cuadrante. Los resultados muestran que *Ps. aeruginosa* no exhibe una respuesta quimiotáctica a la presencia de HHL, siendo el número de células que nadan hacia la HHL proporcional a la concentración aplicada al pocillo y por lo tanto a la fuerza del gradiente de concentración (Figura 4).

### Referencias

- Documento US-6.309.651  
 Documento WO 01/26650  
 Documento WO 01/74801  
 Documento WO 92/01047  
 Documento GB2003/003529  
 Shih and Huang, 2002 J. Antimicrobial Chemotherapy 49: 309-314  
 Wozniak et al., 2003 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (13): 7907-7912  
 Harrisson-Baestra et. al., 2003 Dermatol. Surg. 29 (6): 631-635  
 Williams et al, 1996 Microbiol-UK 142: 881-888  
 Stintzi et al., 1998 FEMS Microbiol Lett. 166 (2): 341-345  
 Glessner et al., 1999 J. Bacteriol. 181 (5): 1623-1629  
 Brint and, Ohman 1995 J. Bacteriol. 177 (24): desde 7155-7163  
 Reimmann et al., 1997 Mol. Microbiol. 24 (2): 309-319  
 Winzer et al., 2000 J. Bacteriol. 182 (22): 6401-6411  
 Gambello and Iglewski 1991 J. Bacteriol. 173 (9): 3000-3009  
 Latifi et al., 1995 Mol. Microbiol 17 (2): 333-343  
 Passador et al, 1993 Science 260: 1127-30  
 Pearson et al., 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1): 197-201  
 Winson et al., 1995 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92 (20): 9427-9431  
 Pesci et al., 1997 J. Bacteriol. 179 (10): 3127-3132  
 Toder et al., 1991 Mol. Microbiol. 5 (8): 2003-2010  
 Gambello et al., 1993 Infect. Immun. 61 (4): 1180-1184  
 Ochsner et al., 1994 J. Bacteriol. 176, 2044-2054  
 Pearson et al., 1995 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (5) 1490-1494  
 Latifi et al., 1996 Mol. Microbiol 21 (6): 1137-1146  
 Winzer et al., 2000 J. Bacteriol. 182 (22): 6401-6411  
 Pesci et al., 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11.229-11.234  
 Burns et al., 2001 J. Infect. Dis. 183: 444-452  
 Singh et al., 2000 Nature 407: 762-764  
 Wu et al., 2000 Microbiology 146: 2481-2493  
 Wu et al., 2004 Microbes and Infection 6: 34-37  
 Manefield et al., 1999 Microbiol. UK 145: 283-291  
 Tepletski et al., 2000 Mol. Plant Microbe. Interact., 13: 637-648  
 Suga and Smith, 2003 Current Opinion in Chemical Biology 7: 586-591  
 Kohler and Milstein, 1975 Nature 256: 495-497  
 Roitt et al., Immunology second edition (1989), Churchill Livingstone, London.  
 Dougall et al, 1994 Tib Tech 12: 372-379  
 McCafferty et al, 1990 Nature 348: 552-554  
 Huston et al., 1993 Int. Rev. Immunol, 10: 195-217  
 Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)  
 Hart et al., 2000 J. Am. Chem. Soc., 122, 460-465  
 Whitcombe et al., 1995 J. Am. Chem. Soc., 117, 7105-7111  
 Ramstrom et al., 1996 Chem. & Biol., 3, 471-477  
 Rachkov et al., 2000 Anal. Chim. Acta. 405, 23-29  
 Conway et al., 2002 J. Bacteriol. 184 (20): 5678-5.685

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo contra la forma libre de una molécula de señal homoserina lactona secretada por las bacterias para su uso en la disminución de una biopelícula establecida producida por una población de bacterias, en el que el anticuerpo es el anticuerpo de cadena única (scAb) G3B12 depositado como NCIMB-41168.
- 5 2. Un anticuerpo para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en el que las bacterias se seleccionan del grupo que consiste de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Acinetobacter baumannii*, *Bordetella pertussis*, *Brucella* sp., *Campylobacter* sp., *Capnocytophaga* sp., *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Kingella kingae*, *Legionella pneumophila*, *Pasteurella multocida*, *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,  
10 *Proteus* sp., *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella* sp., *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*, *Veillonella* sp., *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides* sp., *Prevotella* sp., *Fusobacterium* sp., *Spirillum minus*, *Aeromonas* sp., *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Acinetobacter* sp., *Flavobacterium* sp.,  
15 *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Xanthomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. y *Streptococcus* spp.
3. Un kit de partes que comprende un anticuerpo, tal como se define en la reivindicación 1 y un antibiótico para la administración separada, posterior o simultánea para la disminución de una biopelícula establecida producida por una población de bacterias.
- 20 4. El uso de un anticuerpo como se define en la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para la disminución de una biopelícula establecida producida por una población de bacterias.
5. Un procedimiento *ex vivo* de disminuir una biopelícula establecida formada por una población de bacterias, comprendiendo dicho procedimiento la administración a la población de bacterias de un anticuerpo contra la forma libre de una molécula de señal homoserina lactona secretada por las bacterias, en el que el anticuerpo es el anticuerpo de cadena única (scAb) G3B12 depositado como NCIMB-41168.

25

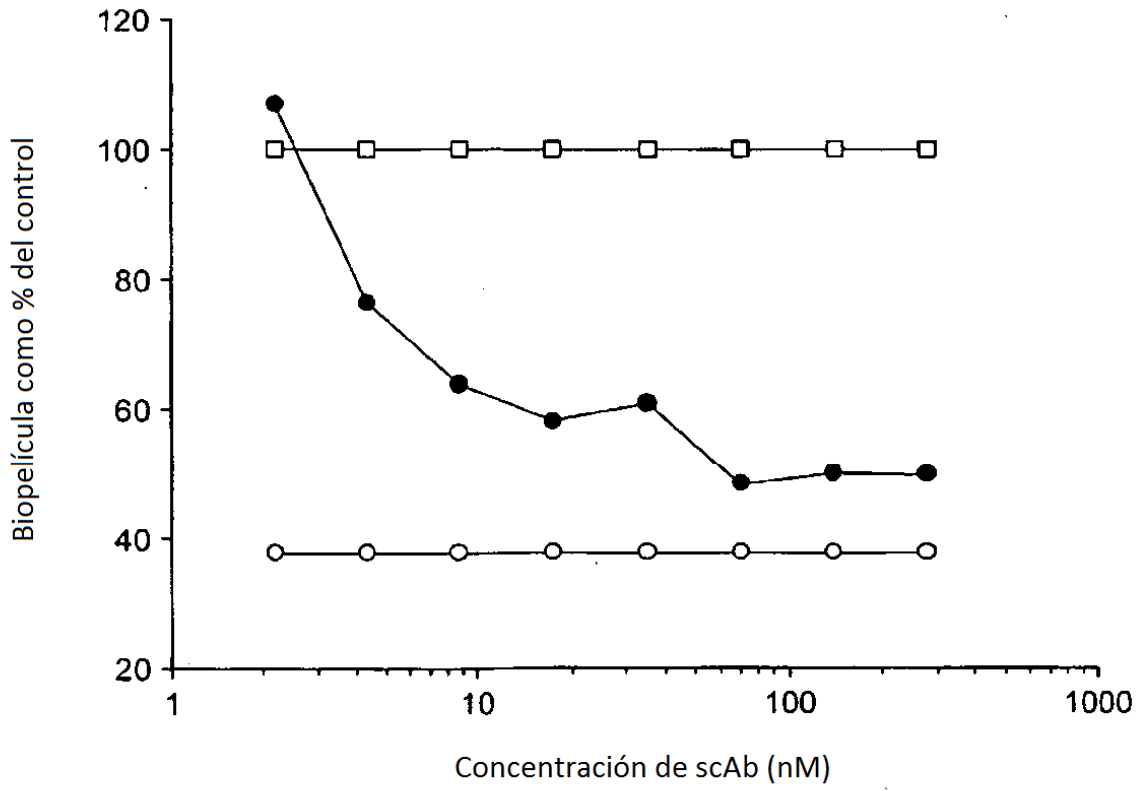


FIG. 1



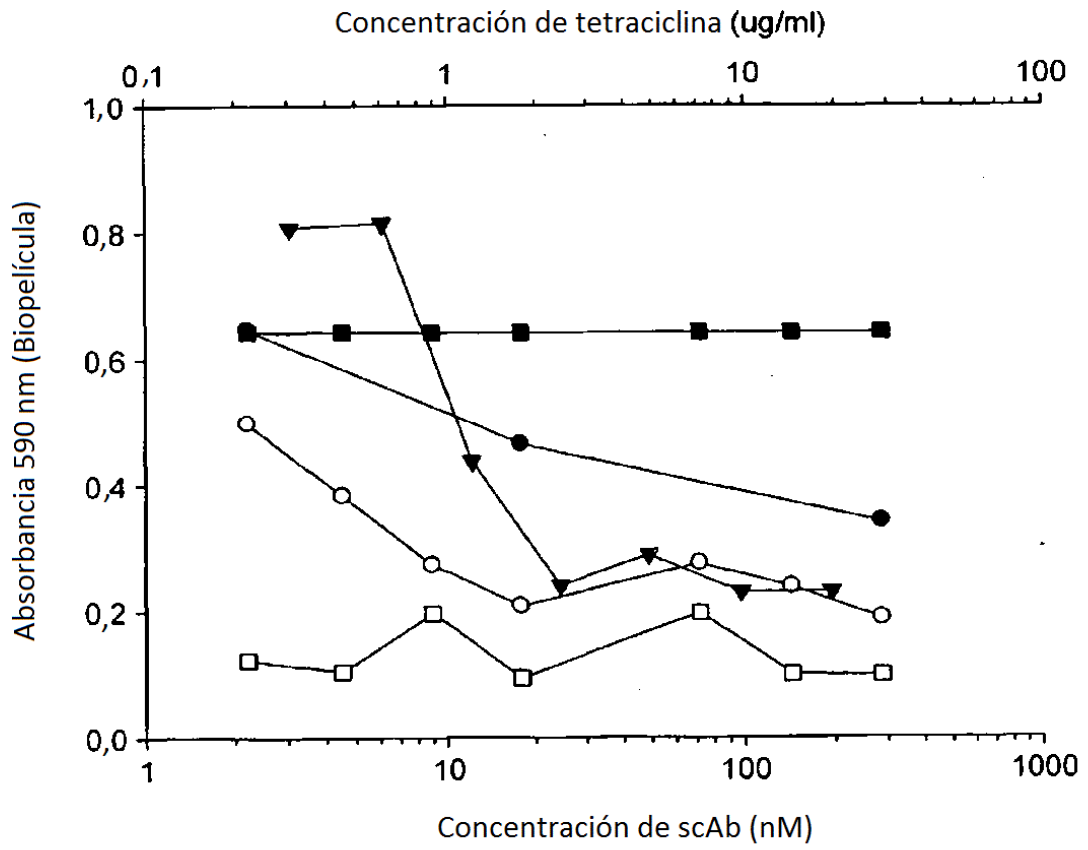


FIG. 2

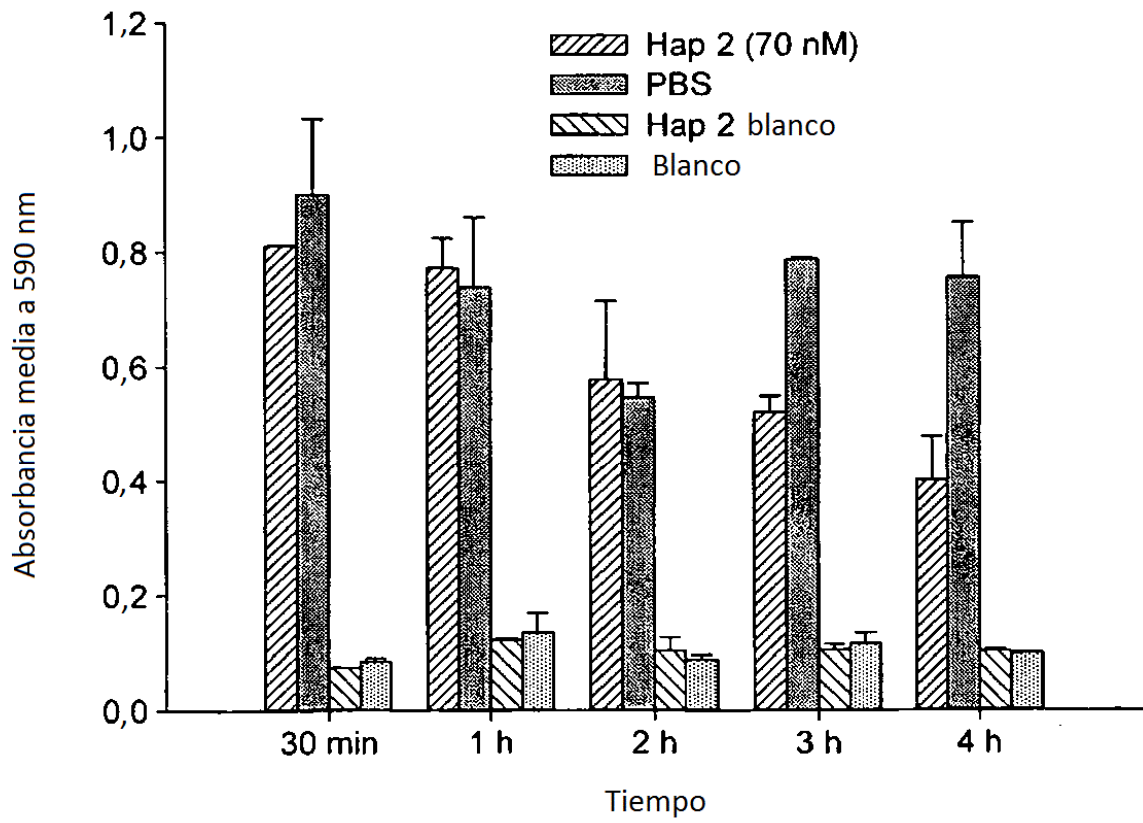
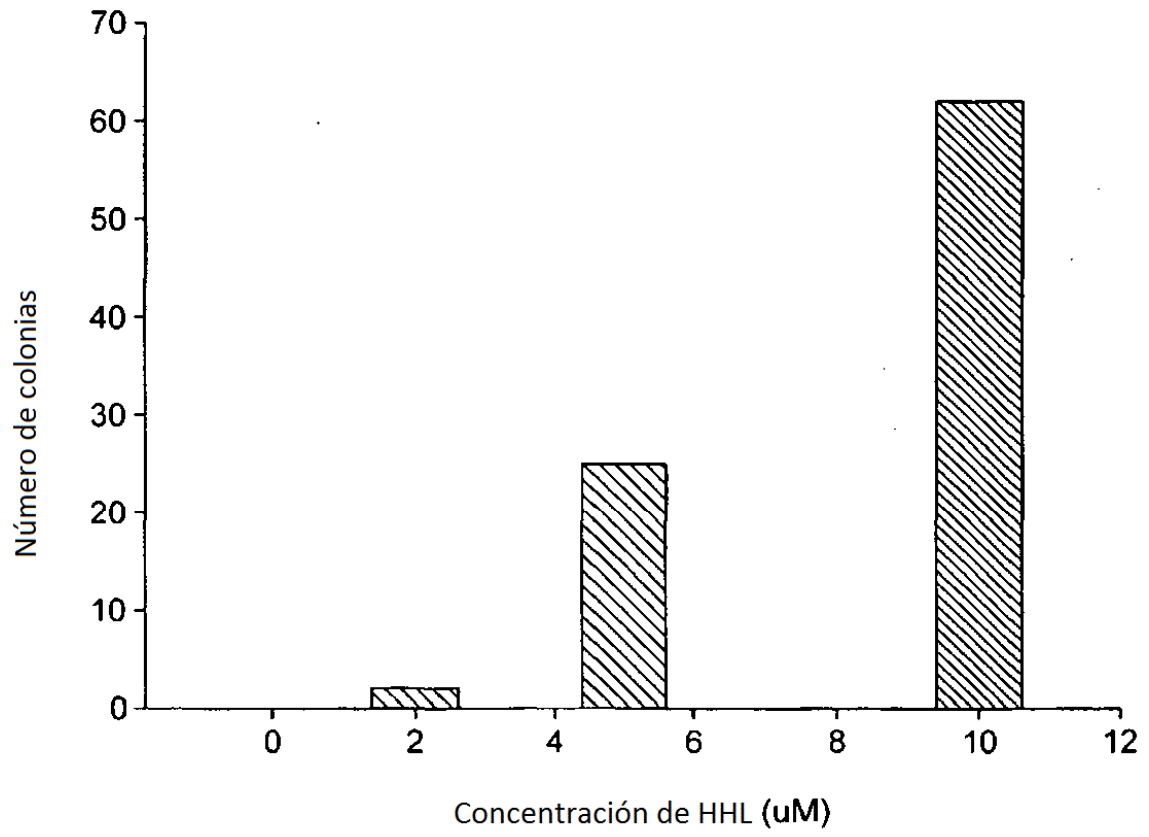


FIG. 3



**FIG. 4**