

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 040**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2009 E 09791040 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2323684**

54 Título: **Uso de un péptido P4 de neumococos para potenciar la opsonofagocitosis en respuesta a un patógeno**

30 Prioridad:

31.07.2008 US 85208 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.09.2014

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)
Centers for Disease Control and Prevention
Technology Transfer Office 4770 Buford Hwy (K79)
Atlanta, GA 30341, US**

72 Inventor/es:

**ADES, EDWIN W.;
RAJAM, GOWRISANKAR;
STEINER, SANDRA;
CARLONE, GEORGE M.;
MELNICK, NIKKOL;
SAMPSON, JACQUELYN S.;
MARTINEZ, JOSEPH E. y
SKINNER, JULIE M.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 493 040 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 péptido P4 de neumococos para potenciar la opsonofagocitosis en respuesta a un patógeno

5 Campo

Esta descripción se refiere a composiciones y Péptidos P4 aislados para su uso en métodos para el tratamiento y/o prevención de infecciones patogénicas en un sujeto y específicamente a la potenciación de la eficacia de anticuerpos opsónicos en la opsonofagocitosis de patógenos.

10

Antecedentes

Durante el último siglo, el desarrollo de agentes para combatir infecciones, tales como infecciones virales, infecciones fúngicas, infecciones bacterianas y similares, ha aumentado enormemente la esperanza de vida promedio en todo el mundo. Sin embargo, patógenos están desarrollando de forma creciente formas para evitar o esquivar los agentes terapéuticos existentes. Por ejemplo, el uso extendido de antibióticos tradicionales, tales como penicilina y compuestos relacionados ha provocado el desarrollo de bacterias que son resistentes a estos antibióticos tradicionales, ejemplificado por el aumento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). De manera similar, los patógenos virales, tales como VIH, son capaces de adquirir resistencia a antivirales en unos pocos ciclos de replicación.

Para combatir el panorama siempre cambiante de patógenos y resistencia emergente a las terapias vigentes, el curso de acción normal para las compañías farmacéuticas es desarrollar una serie siempre creciente de agentes terapéuticos de molécula pequeña. Como alternativo, se han desarrollado vacunas que estimulan al organismo a combatir una infección provocando respuestas de anticuerpo contra el patógeno o patógenos diana.

Los anticuerpos protegen contra el ataque de patógenos reconociendo y uniéndose a antígenos en el patógeno para facilitar la retirada o "eliminación" de los patógenos mediante un proceso llamado fagocitosis, en el que células fagocíticas (por ejemplo neutrófilos y macrófagos) identifican, tragan, y después destruyen los patógenos. Sin embargo, algunos patógenos, tales como ciertas bacterias, pueden evitar la fagocitosis. Las bacterias pueden producir una "cápsula" que inhibe la adherencia del fagocito. Los anticuerpos opsónicos superan estas defensas mediante su unión a la cápsula o a otros antígenos diana sobre las bacterias, en un proceso llamado opsonización. Esto desencadena la cascada del complemento, para producir una serie de proteínas séricas con actividades opsónica y lítica. Los anticuerpos opsónicos con componentes de complemento, tales como C3a y C5a, se unen a las bacterias para hacer a las bacterias extremadamente atractivas a los fagocitos y potencian la velocidad de eliminación del torrente sanguíneo. Recientemente, las investigaciones han explotado los anticuerpos opsónicos purificando anticuerpos opsónicos y administrando estos anticuerpos a sujetos para tratar infecciones. Aunque el uso de anticuerpos opsónicos se ha mostrado algo prometedor en el tratamiento y/o prevención de infecciones por patógenos, existe la necesidad de potenciar la eficacia de estos anticuerpos, por ejemplo para reducir la cantidad de anticuerpos opsónicos necesaria para conseguir un resultado terapéuticamente eficaz. Los métodos descritos en este documento cumplen esas necesidades.

Sumario

La invención se expone en las reivindicaciones. Los métodos descritos se refieren a la potenciación de las propiedades opsónicas de anticuerpos opsónicos para aumentar la opsonofagocitosis de patógenos. Los métodos para el tratamiento del organismo humano o animal no se reivindican. Esta potenciación se basa en el sorprendente descubrimiento de que péptidos P4, que incluyen la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N° 1, aumentan la capacidad de las células efectoras de internalizar patógenos unidos por anticuerpos opsónicos. Como los péptidos P4 aumentan la capacidad de las células efectoras de opsonofagocitar patógenos unidos por anticuerpos opsónicos en una forma no discriminatoria, los péptidos P4 pueden usarse para abordar cualquier patógeno de interés usando un anticuerpo opsónico específico para cualquiera patógeno de interés. En ejemplos específicos, se administra un P4 péptido junto con un anticuerpo opsónico que es específico (por ejemplo se une específicamente) para un patógeno seleccionado de interés. Por tanto, los métodos descritos en este documento pueden usarse para inhibir y/o tratar una infección provocada por cualquiera patógeno de interés.

Los métodos descritos para potenciar la opsonofagocitosis de un patógeno de interés en un sujeto incluyen administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido P4 aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N° 1. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo opsónico aislado o un fragmento del mismo (o incluso múltiples anticuerpos opsónicos) que se une específicamente a un antígeno presente de la superficie del patógeno de interés también se puede administrar al sujeto, por ejemplo para abordar un patógeno de interés. Administrando el péptido P4 se aumenta la actividad opsónica del anticuerpo opsónico (se produzca el anticuerpo opsónico por el sujeto o se administre al sujeto), potenciando de este modo la opsonofagocitosis de un patógeno de interés. En algunos ejemplos del método descrito, la proteína del complemento aislada o un fragmento de la misma (por ejemplo, un fragmento C3a, C3b, iC3b, C3d, C4b, o C5a de una proteína del complemento) también se administra al sujeto. En algunas realizaciones del método descrito también se

administra antibiótico al sujeto.

Los métodos descritos se pueden usar para potenciar la opsonofagocitosis de cualquier patógeno de interés usando un anticuerpo opsonico que se une a un patógeno seleccionado de interés (o anticuerpos que se unen a varios patógenos de interés), por ejemplo patógenos bacterianos de interés, patógenos virales de interés, células infectadas por virus, o patógenos fúngicos de interés, tales como aquellos expuestos en el sumario de términos. En ejemplos específicos, un patógeno de interés es *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis* o *Staphylococcus aureus*, tal como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). En algunos ejemplos, el medicamento se usa para potenciar la opsonofagocitosis de cualquier patógeno de interés, por ejemplo en el tratamiento de una infección provocada por un patógeno de interés, tal como un patógeno bacteriano de interés, patógeno viral de interés, células infectadas por virus, o patógeno fúngico de interés, tales como aquellos expuestos en el sumario de términos.

También se describen composiciones, tales como composiciones terapéuticas, para su uso en el tratamiento y/o inhibición de una infección por un patógeno de interés, para su uso en la fabricación de un medicamento, y/o para su uso como medicamento. La composiciones terapéuticas descritas incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido P4 aislado que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N° 1 y una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos opsonicos aislados o un fragmento de los mismos que se unen específicamente a un antígeno presente sobre la superficie de un patógeno de interés. En algunas realizaciones, las composiciones terapéuticas descritas incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína del complemento aislada o fragmento de la misma, tal como uno o más de C3a, C3b, iC3b, C3d, C4b, o C5a. En algunas realizaciones las composiciones terapéuticas descritas incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico.

Los anteriores y otros objetos, características, y ventajas de la invención llegarán a ser más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que se desarrolla con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La **FIG. 1A-1C** es una serie de gráficos de barras que demuestran la potenciación mediada por P4 de la opsonofagocitosis *in vitro*. La **FIG. 1A** es un gráfico de barras que muestra el efecto de la concentración de anticuerpo sobre la opsonofagocitosis. A una dilución 1:8 de gamma globulina, la eliminación opsonofagocítica (OPK) de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 3 (WU2) aumentaba en un 35 % en comparación con el control; este efecto se tituló con la dilución, en paralelo con los resultados obtenidos para los controles a una dilución 1:32. La **FIG. 1B** es un gráfico de barras que muestra el efecto del complemento sobre la opsonofagocitosis. Se requirió complemento de cría de conejo para OPK *in vitro*, independientemente de la presencia o ausencia de P4. El grupo de ensayo sin complemento recibió complemento inactivado por calor (56 °C durante 30 minutos). La **FIG. 1C** es un gráfico de barras que muestra el efecto de la concentración de P4 sobre la opsonofagocitosis. Puede observarse un aumento gradual en la OPK de *S. pneumoniae* serotipo 3 (WU2) sobre el control con el aumento en la concentración de P4. Se usó gamma globulina a una dilución 1:8 como fuente de IgG específica de serotipo.

La **FIG. 2A-2C** es una serie de gráficos de barras que demuestran la potenciación mediada por P4 de la opsonofagocitosis *in vitro* determinada por citometría de flujo. La **FIG. 2A** es un gráfico de barras que demuestra que P4 (100 µg/ml) aumentaba el estallido respiratorio en granulocitos derivados de HL-60. Se usó suero de control de calidad propio (QC2) para ensayar la captación opsonofagocítica (OPU) de perlas recubiertas con polisacárido capsular (Ps) de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 23F marcado con OXYBURST® por granulocitos. La señal OXYBURST® tuvo su máximo a una dilución de suero de 1:3200. La **FIG. 2B** es un gráfico de barras que demuestra que P4 (100 µg/ml) aumentaba la OPU de perlas recubiertas con Ps de *S. pneumoniae* serotipo 14 por granulocitos recién aislados de sangre humana en presencia de QC2. La **FIG. 2C** es un gráfico de barras que demuestra que P4 (100 µg/ml) aumentaba la OPU de perlas recubiertas con Ps de *N. meningitidis* A por monocitos derivados de HL-60 en presencia de suero de control de calidad propio QC268.

La **FIG. 3** es un gráfico que demuestra la atribución de protección contra exposición a *Streptococcus pneumoniae* serotipo 3 (WU2) intranasal letal por P4 con IgG específica de serotipo. La inyección intravenosa (iv) de P4 (100 µg/ratón) con gamma globulina (100 µl/ratón) a las 72 y 96 horas después de la exposición proporcionó protección altamente significativa (80 %; P < 0,001) contra infección por infección con *S. pneumoniae* WU2 letal, seguida en eficacia por la vía intraperitoneal (ip) de administración (60 %; P < 0,001).

La **FIG. 4** es un gráfico que demuestra la supervivencia de ratones en diversos brazos de tratamiento y de ratones de control después de exposición a *S. pneumoniae* serotipo 3 (WU2). Una inyección iv de única dosis de una mezcla de P4 y gamma globulina (IVIG) con inyección ip de ceftriaxona (Ceft) proporcionó protección muy significativa (100 %; P < 0,05) en comparación con la de controles no tratados.

La **FIG. 5** es un gráfico que muestra los efectos sobre ratones previamente rescatados (◆) con terapia de combinación con P4 que se volvieron a infectar con *S. pneumoniae* serotipo 3 (WU2) en el día 28. Se administró una única dosis de P4, gamma globulina (IVIG), y ceftriaxona 2 días después. Todos los animales (100 %) estuvieron protegidos.

La **FIG. 6** es una serie de gráficos de barras que muestran los resultados de un ensayo de eliminación opsonofagocítica (OPKA) *in vitro* con PMN de sangre periférica aislados de ratones 1 y 2 horas después de

infección o de ratones no infectados. Se usó gamma globulina (IVIG) como fuente para anticuerpos específicos de serotipo. La adición de P4 aumentó la eliminación opsonofagocítica de *S. pneumoniae* serotipo 3 (WU2) en ≥ 80 % sobre la de PMN de ratones de control que no recibieron P4 ($P < 0,05$).

5 Secuencias

Las secuencias de aminoácidos enumeradas en la lista de secuencias adjunta se muestran usando el código de tres letras convencional para aminoácidos.

10 La **SEC ID N° 1** es la secuencia de aminoácidos de un péptido P4 ejemplar.

Descripción detallada

15 I. Sumario de términos

Salvo que se indique de otro modo, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular en Benjamin Lewin, Genes VII, publicado por Oxford University Press, 1999; Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994; y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995; y otras referencias similares.

Como se usa en este documento, la forma singular "un", "una" y "el", "la" se refiere tanto al singular como al plural, salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "péptido P4" incluye péptidos individuales o plurales y puede considerarse equivalente a la expresión "al menos un péptido P4".

25 Como se usa en este documento, el término "comprende" significa "incluye". Por tanto, "que comprende un péptido P4" significa "que incluye un péptido P4" sin excluir otros elementos.

30 Debe entenderse adicionalmente que todos los tamaños de base o tamaños de aminoácido, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos se aproximan, y se proporcionan con fines descriptivos, salvo que se indique lo contrario. Aunque pueden usarse muchos métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en este documento, a continuación se describen métodos y materiales particularmente adecuados. En caso de conflicto, predominará la presente memoria descriptiva, incluyendo explicaciones de términos. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son ilustrativos solamente y no pretenden ser limitantes.

35 Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la invención, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos:

40 **Administración:** la introducción de una composición en un sujeto mediante una vía elegida. Por ejemplo, si la vía elegida es intravenosa, la composición se administra introduciendo la composición en una vena del sujeto. De manera similar, si la vía de administración es intranasal, la composición se administra a través de la nariz.

45 **Animal:** un organismo vertebrado o invertebrado pluricelular vivo, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término mamífero incluye tanto seres humanos como mamíferos no humanos. De manera similar, el término "**sujeto**" incluye tanto seres humanos como sujetos de veterinaria, tales como primates no humanos. Por tanto, la administración a un sujeto puede incluir la administración a un sujeto humano. Ejemplos particulares de sujetos de veterinaria incluyen animales domésticos (tales como gatos y perros), ganado (por ejemplo, ganado vacuno, caballos, cerdos, ovejas, y cabras), animales de laboratorio (por ejemplo, ratones, conejos, ratas, jerbos, cobayas, y primates no humanos), así como aves, reptiles, y peces.

50 **Antibiótico:** un compuesto, composición, o sustancia que inhibe el crecimiento y/o elimina bacterias. El término antibiótico también se puede usar para hacer referencia a más de un antibiótico. Ejemplos de antibióticos que se puede usar con los métodos y composiciones de esta revelación incluyen sin limitación, aminoglucósidos (tales como amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina, y paromomicina); ansamicinas (tales como geldanamicina, y herbimicina); carbacefems (tales como loracarbef, ertapenem, doripenem, imipenem/cilastatina, y meropenem); cefalosporinas (tales como cefadroxilo, cefazolina, cefalotina, cefalexina, cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozilo, cefuroxima, cefixima, cefdinir, cefditoren, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftriaxona, cefepima, y ceftobiprol); glucopéptidos (tales como teicoplanina y vancomicina); macrólidos (tales como azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina, y espectinomina); monobactamas (tales como aztreonam); penicilinas (tales como amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, metilicina, nafcilina, oxacilina, penicilina, piperacilina, y ticarcilina); polipéptidos (tales como bacitracina, colistina, y polimixina b); quinolonas (tales como ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, trovafloxacina, grepafloxacina, y esparfloxacina); sulfonamidas (tales como mafenida, prontosil (arcaico), sulfacetamida, sulfametizol, sulfanilimida (arcaico), sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim, y trimetoprim-sulfametoxazol); tetraciclinas (tales como demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, y tetraciclina); y otros (tales como arsenamina,

cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, etambutol, fosfomicina, ácido fusídico, furazolidona, isoniazid, linezolid, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoina, platensimicina, pirazinamida, quinupristina/dalfopristina, rifampicina, tiamfenicol, y tinidazol).

Antígeno: un compuesto, composición, o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos (tales como anticuerpos funcionales) o una respuesta de células T en un mamífero, incluyendo composiciones que se inyectan, se absorben o introducen de otra manera en un mamífero. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, péptidos, lípidos, polisacáridos, y ácidos nucleicos que contienen determinantes antigénicos, tales como aquellos reconocidos por una célula inmune. En algunos ejemplos, los antígenos incluyen péptidos derivados de un patógeno de interés. Patógenos ejemplares incluyen bacterias, hongos, virus y parásitos. Un antígeno de un patógeno de interés se puede usar para producir un anticuerpo opsonico que se una específicamente al patógeno de interés y participe en la opsonofagocitosis del patógeno.

Anticuerpo: inmunoglobulinas y partes activas inmunológicamente activas ("fragmentos") de las mismas, tales como moléculas que incluyen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un antígeno. Un anticuerpo de origen natural (tal como IgG, IgM, e IgA) incluye cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Ejemplos de partes inmunológicamente activas de las mismas incluyen, aunque sin limitación, partes Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc y Fv. Los **anticuerpos funcionales** son anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno, por ejemplo un antígeno presente en la superficie de un patógeno, puede permitir de forma eficaz la fijación del complemento, y también interactúan con una célula efectora, donde la interacción del anticuerpo y la célula efectora provoca la internalización del anticuerpo por la célula efectora y la opsonofagocitosis del patógeno.

Patógeno bacteriano: una bacteria que causa enfermedad (bacteria patogénica). Ejemplos de bacterias patogénicas contra las cuales puede potenciarse la opsonofagocitosis de acuerdo con los métodos descritos incluyen sin limitación una cualquiera o más de (o cualquier combinación de) *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus* sp., *Actinomycetes*, *Actinomyces* sp. (tal como *Actinomyces israelii* y *Actinomyces naeslundii*), *Aeromonas* sp. (tal como *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* biovar *sobria* (*Aeromonas sobria*), y *Aeromonas caviae*), *Anaplasma fagocytophilum*, *Anaplasma marginale*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacillus* sp. (tal como *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, y *Bacillus stearothermophilus*), *Bacteroides* sp. (tal como *Bacteroides fragilis*), *Bartonella* sp. (tal como *Bartonella bacilliformis* y *Bartonella henselae*, *Bifidobacterium* sp., *Bordetella* sp. (tal como *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, y *Bordetella bronchiseptica*), *Borrelia* sp. (tal como *Borrelia recurrentis*, y *Borrelia burgdorferi*), *Brucella* sp. (tal como *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*), *Burkholderia* sp. (tal como *Burkholderia pseudomallei* y *Burkholderia cepacia*), *Campilobacter* sp. (tal como *Campilobacter jejuni*, *Campilobacter coli*, *Campilobacter lari* y *Campilobacter fetus*), *Capnocytophaga* sp., *Cardiobacterium hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Citrobacter* sp. *Coxiella burnetii*, *Corynebacterium* sp. (tal como *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium jeikeum* y *Corynebacterium*), *Clostridium* sp. (tal como *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani*), *Eikenella corrodens*, *Enterobacter* sp. (tal como *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*, incluyendo *Escherichia coli* oportunista, tal como *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enteropatogénica, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroagregante y *E. coli* uropatogénica), *Enterococcus* sp. (tal como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*), *Ehrlichia* sp. (tal como *Ehrlichia chafeensis* y *Ehrlichia canis*), *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Eubacterium* sp., *Francisella tularensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Gemella morbillorum*, *Haemophilus* sp. (tal como *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus haemolyticus* y *Haemophilus paraahaemolyticus*), *Helicobacter* sp. (tal como *Helicobacter pylori*, *Helicobacter cinaedi* y *Helicobacter fennelliae*), *Kingella kingii*, *Klebsiella* sp. (tal como *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella granulomatis* y *Klebsiella oxytoca*), *Lactobacillus* sp., *Listeria monocytogenes*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Peptostreptococcus* sp., *Mannheimia hemolytica*, *Moraxella catarrhalis*, *Morganella* sp., *Mobiluncus* sp., *Micrococcus* sp., *Mycobacterium* sp. (tal como *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, y *Mycobacterium marinum*), *Mycoplasma* sp. (tal como *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, y *Mycoplasma genitalium*), *Nocardia* sp. (tal como *Nocardia asteroides*, *Nocardia cyriacigeorgica* y *Nocardia brasiliensis*), *Neisseria* sp. (tal como *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*), *Pasteurella multocida*, *Plesiomonas shigelloides*, *Prevotella* sp., *Porphyromonas* sp., *Prevotella melaninogenica*, *Proteus* sp. (tal como *Proteus vulgaris* y *Proteus mirabilis*), *Providencia* sp. (tal como *Providencia alcalifaciens*, *Providencia rettgeri* y *Providencia stuartii*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes*, *Rhodococcus equi*, *Rickettsia* sp. (tal como *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia akari* y *Rickettsia prowazekii*, *Orientia tsutsugamushi* (anteriormente: *Rickettsia tsutsugamushi*) y *Rickettsia typhi*), *Rhodococcus* sp., *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Salmonella* sp. (tal como *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhimurium*), *Serratia* sp. (tal como *Serratia marcescens* y *Serratia liquifaciens*), *Shigella* sp. (tal como *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*), *Staphylococcus* sp. (tal como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*), *Streptococcus* sp. (tal como *Streptococcus pneumoniae* (por ejemplo *Streptococcus pneumoniae* serotipo 4 resistente a cloranfenicol, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 6B resistente a espectinomina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 9V resistente a estreptomina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 14 resistente a eritromicina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 14 resistente a optoquina,

Streptococcus pneumoniae serotipo 18C resistente a rifampicina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F resistente a tetraciclina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F resistente a penicilina, y *Streptococcus pneumoniae* serotipo 23F resistente a trimetoprim, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 4 resistente a cloranfenicol, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 6B resistente a espectinomicina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 9V resistente a estreptomina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 14 resistente a optoquina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 18C resistente a rifampicina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F resistente a penicilina, o *Streptococcus pneumoniae* serotipo 23F resistente a trimetoprim), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, estreptococos del Grupo A, *Streptococcus pyogenes*, estreptococos del Grupo B, *Streptococcus agalactiae*, estreptococos del Grupo C, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus equismilis*, estreptococos del Grupo D, *Streptococcus bovis*, estreptococos del Grupo F, y *Streptococcus anginosus*, estreptococos del Grupo G), *Spirillum minus*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema sp.* (tal como *Treponema carateum*, *Treponema petenue*, *Treponema pallidum* y *Treponema endemicum*, *Tropheryma whippelii*, *Fureaplasma furealyticum*, *Veillonella sp.*, *Vibrio sp.* (tal como *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio metchnikovii*, *Vibrio damsela* y *Vibrio furnisii*), *Yersinia sp.* (tal como *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, y *Yersinia pseudotuberculosis*) y *Xanthomonas maltophilia* entre otros.

Célula: una célula vegetal, animal, de insecto, bacteriana, o fúngica.

Sustituciones conservativas de aminoácido, que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares, son bien conocidas en la técnica. Los siguiente seis grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas los unos para los otros:

- 1) alanina (A), serina (S), treonina (T);
- 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 3) asparagina (N), glutamina (Q);
- 4) arginina (R), lisina (K);
- 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); y
- 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W).

No todas posiciones de restos en una proteína tolerarán una sustitución por lo demás "conservativa". Por ejemplo, si un resto aminoacídico es esencial para una función de la proteína, incluso una sustitución por lo demás conservativa puede alterar esa actividad.

Complemento: un sistema de proteínas plasmáticas implicado en la defensa inmune. Después de la activación por complejos antígeno-anticuerpo, las proteínas del complemento lisan las células antigénicas, atraen células fagocíticas, y ayudan a la destrucción de células antigénicas por opsonofagocitosis. En mamíferos, el sistema del complemento está compuesto por una serie de aproximadamente 25 proteínas que trabajan "complementando" la actividad de los anticuerpos en la destrucción de bacterias, o facilitando la opsonofagocitosis o perforando la membrana celular bacteriana. El complemento también ayuda a que el organismo se deshaga de complejos antígeno-anticuerpo opsónico, por ejemplo por eliminación de un patógeno que está unido por el anticuerpo opsónico.

Las proteínas del complemento circulan en la sangre en una forma inactiva. Cuando la primera de las sustancias del complemento se activa-habitualmente por anticuerpo bloqueado con un antígeno. Según se activa cada componente a su vez, actúa sobre el próximo en una secuencia precisa de etapas reguladas cuidadosamente conocidas como la "cascada del complemento".

Los fragmentos del complemento (tales como C3a, C3b, iC3b, C3d, C4b, o C5a, que quedan unidos a antígeno durante la activación del complemento) desencadenan la opsonofagocitosis por unión a receptores específicos de superficie celular (tales como receptores Fc y receptores C3b en neutrófilos y macrófagos, y receptores C3d en macrófagos). En algunos ejemplos, la actividad de las células efectoras para opsonofagocitosis de complejos anticuerpo/antígeno se potencia por la presencia de péptidos P4.

Células efectoras: células capaces de unirse a complejos anticuerpo/antígeno e internalizar dichos complejos. En ejemplos particulares, las células efectoras expresan receptores Fc, tales como Fc γ R1, Fc γ R2 y Fc γ R3 que se unen a complejos anticuerpo/antígeno y facilitan la internalización. En algunos ejemplos, las células efectoras se obtienen del suero de un individuo (tal como leucocitos de sangre periférica, PBL) o de un cultivo *in vitro*. Ejemplos de células efectoras incluyen, aunque sin limitación: macrófagos, fagocitos mononucleares, células citotóxicas naturales, y granulocitos tales como neutrófilos y eosinófilos. En un ejemplo particular, la célula efectora es una célula de leucemia promielocítica humana diferenciada, tal como una célula HL-60 diferenciada.

Epítipo: un determinante antigénico. Existen grupos químicos o secuencias peptídicas particulares sobre una molécula que son antigénicos, de modo que provocan una respuesta inmune específica. Un anticuerpo se une a un epítipo antigénico particular, tal como un epítipo de la superficie de un patógeno.

Exógeno: una sustancia, tal como un anticuerpo opsonico aislado o proteína del complemento o fragmento de la misma, que se obtiene de una fuente diferente al sujeto al que se administra. Por ejemplo, cuando se administra un anticuerpo opsonico aislado exógeno a un sujeto de acuerdo con los métodos y composiciones descritos en este documento, ese anticuerpo aislado no se obtiene, por ejemplo se aísla del mismo sujeto al cual se administra.

Patógeno fúngico: un hongo que causa enfermedad. Ejemplos de patógenos fúngicos para los cuales se puede potenciar la opsonofagocitosis de acuerdo con el métodos descritos incluyen sin limitación *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Pityrosporum orbiculare* (*Malassezia furfur*), *Candida sp.* (tal como *Candida albicans*), *Aspergillus sp.* (tal como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus clavatus*), *Cryptococcus sp.* (tal como *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus laurentii* y *Cryptococcus albidus*), *Histoplasma sp.* (tal como *Histoplasma capsulatum*), *Pneumocystis sp.* (tal como *Pneumocystis jirovecii*), y *Stachybotrys* (tal como *Stachybotrys chartarum*) entre otros.

Inhibición o tratamiento de una enfermedad: inhibición del desarrollo completo de una enfermedad o afección, por ejemplo, en un sujeto que está en riesgo de una enfermedad tal como una infección con un patógeno, por ejemplo un patógeno bacteriano, fúngico o viral. "Tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica después de que haya comenzado a desarrollarse. El término "mejorar", con referencia a una enfermedad o afección patológica, se refiere a cualquier efecto beneficioso observable del tratamiento. El efecto beneficioso puede evidenciarse, por ejemplo, por una aparición retardada de los síntomas clínicos de la enfermedad en un sujeto susceptible, una reducción en la gravedad de algunos o todos los síntomas clínicos de la enfermedad, una progresión más lenta de la enfermedad, una mejora en la salud global o bienestar del sujeto, o por otros parámetros bien conocidos en la técnica que son específicos para la enfermedad particular. Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad o muestra signos solamente tempranos con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar la patología.

Aislado: un componente biológico "aislado" (tal como una proteína, por ejemplo péptido P4, anticuerpo o proteína del complemento) se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos en que existe el componente de forma natural, tal como otro ADN cromosómico y extracromosómico, ARN, y proteínas. Las proteínas o péptidos se han "aislado" incluyen proteínas purificadas por métodos convencionales de purificación. El término también abarca proteínas o péptidos preparados por expresión recombinante en una célula hospedadora así como proteínas o péptidos sintetizados químicamente. Aislado no requiere pureza absoluta, y puede incluir moléculas proteicas o peptídicas que están al menos un 50 % aisladas, tal como al menos un 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, o incluso 100 % aisladas.

Opsonina: una molécula que queda adherida a la superficie de un patógeno, tal como un patógeno bacteriano, fúngico o viral, que se reconoce por receptores de superficie de neutrófilos y macrófagos y que aumenta la eficacia de fagocitosis del microbio. Las opsoninas incluyen anticuerpos IgG, que se reconocen por el receptor Fc γ en fagocitos, y fragmentos de proteínas del complemento, que se reconocen por CR1 (CD35) y por la integrina Mac-1 de leucocitos.

Opsonofagocitosis: el proceso de adhesión de opsoninas a superficies microbianas para dirigir a los microbios a fagocitosis por células efectoras (tales como macrófagos y monocitos) en presencia de opsoninas séricas específicas. Las opsoninas incluyen cualquier sustancia que se una a antígenos particulados e induzca su fagocitosis por células efectoras. Opsoninas ejemplares incluyen anticuerpos opsonizantes (inmunoglobulinas IgM, IgG1, IgG2, IgG3 e IgA específicas para el antígeno) y ciertos fragmentos del complemento (C3a, C3b, iC3b, C3d, C4b, o C5a, que llegan a unirse al antígeno durante la activación del complemento), ambos cuales desencadenan la fagocitosis por unión a receptores específicos de superficie celular (tales como receptores Fc y receptores C3b en neutrófilos y macrófagos, y receptores C3d en macrófagos). En algunos ejemplos, la actividad de las células efectoras para opsonofagocitosis de complejos anticuerpo/antígeno se potencia por la presencia de péptidos P4.

Péptido: cualquier compuesto, compuesto de aminoácidos, análogos de aminoácidos, unidos químicamente juntos. Péptido como se usa en este documento incluye oligómeros de aminoácidos, análogos de aminoácidos, o péptidos pequeños y grandes, incluyendo polipéptidos o proteínas. Cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o modificación post-traduccional (tal como glucosilación o fosforilación). "Péptido" se aplica a polímeros de aminoácidos, a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos no de origen natural así como en los que uno o más restos aminoácídicos es un aminoácido no natural, por ejemplo un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente. En algunas realizaciones, el péptido es un péptido P4, que puede incluir, aunque sin limitación, cualquiera de las modificaciones descritas en este documento. Un "resto" se refiere a un aminoácido o mimético de aminoácido incorporado en un polipéptido por un enlace amida o mimético de enlace amida. Un péptido tiene un extremo amino terminal (N-terminal) y un extremo carboxi terminal (C-terminal). "Péptido" se usa de forma intercambiable con polipéptido o proteína, y se usa de forma intercambiable en este documento para hacer referencia a un polímero de restos aminoácídicos.

Los aminoácidos generalmente se unen químicamente juntos mediante enlaces amida (CONH). Además, los aminoácidos pueden unirse juntos por otros enlaces químicos. Por ejemplo, los enlaces para aminoácidos o análogos de aminoácidos pueden incluir CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (cis y trans), -COCH₂-, -

CH(OH)CH₂-, y -CHH₂SO- (estos y otros pueden encontrarse en Spatola, en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Datos (marzo 1983), Vol. 1, Punto 3, Peptide Backbone Modifications (revisión general); Morley, Trends Pharm Sci pág. 463 - 468, 1980; Hudson, et al., Int J Pept Prot Res 14:177 - 185, 1979; Spatola et al. Life Sci 38:1243 - 1249, 1986; Harm J. Chem. Soc Perkin Trans. 1307 - 314, 1982; Almquist et al. J. Med. Chem. 23:1392 - 1398, 1980; Jennings-White et al. Tetrahedron Lett 23:2533, 1982; Holladay et al. Tetrahedron. Lett 24:4401 - 4404, 1983; y Hruby Life Sci 31:189 - 199, 1982.

Los péptidos pueden modificarse por diversas técnicas químicas para producir derivados que tengan esencialmente la misma actividad que las proteínas sin modificar, y opcionalmente que tengan otras propiedades deseables. Por ejemplo, los grupos ácido carboxílico de la proteína, ya sean carboxilo-terminales o de cadena lateral, se pueden proporcionar en forma de una sal de un catión farmacéuticamente aceptable o esterificarse para formar un éster C₁-C₁₆, o convertirse en una amida de fórmula NR₁R₂ en la que R₁ y R₂ son cada uno independientemente H o alquilo C₁-C₁₆, o combinarse para formar un anillo heterocíclico, tal como un anillo de 5- o 6-miembros. Los grupos amino de la proteína, ya sean amino-terminales o de cadena lateral, puede estar en forma de una sal de adición ácido farmacéuticamente aceptable, tal como las sales HCl, HBr, acética, benzoica, tolueno sulfónica, maleica, tartárica y otra sales orgánicas, o se pueden modificar en alquilo C₁-C₁₆ o dialquil amino o convertirse adicionalmente en una amida.

Los grupos hidroxilo de las cadenas laterales de las proteínas pueden convertirse en alcoxi C₁-C₁₆ o en un éster C₁-C₁₆ usando técnicas bien reconocidas. Los anillos fenilo y fenólicos de las cadenas laterales de la proteína pueden sustituirse con uno o más átomos de halógeno, tales como flúor, cloro, bromo o yodo, o con alquilo C₁-C₁₆, alcoxi C₁-C₁₆, ácidos carboxílicos y ésteres de los mismos, o amidas de dichos ácidos carboxílicos. Los grupos metileno de las cadenas laterales de las proteínas pueden prolongarse hasta alquilenos C₂-C₄ homólogos. Los tioles pueden protegerse con uno cualquiera de varios grupos protectores bien reconocidos, tales como grupos acetamida. Los especialistas en la técnica también reconocerán métodos para introducir estructuras cíclicas en las proteínas para seleccionar y proporcionar restricciones conformacionales a la estructura que provoquen estabilidad potenciada.

Vehículos farmacéuticamente aceptables: los vehículos farmacéuticamente aceptables de uso con los métodos descritos son vehículos convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, por E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª edición, 1975, describe composiciones y formulaciones adecuadas para suministro farmacéutico de péptidos y proteínas, tales como péptidos P4, anticuerpos opsónicos y proteínas del complemento, o fragmentos de las mismas.

En general, la naturaleza del vehículo dependerá del el modo particular de administración que se esté empleando. Por ejemplo, las formulaciones parenterales habitualmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol, o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (tales como formas de polvo, píldora, comprimido, o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, o estearato de magnesio. Además de vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes, y agentes tamponantes del pH y similares, por ejemplo, acetato sódico o monolaurato de sorbitán.

Agente farmacéutico o fármaco: un compuesto o composición química capaz de inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra apropiadamente a un sujeto.

Serotipo: el genotipo de un organismo unicelular, tal como una bacteria, definido por antisueros contra determinantes antigénicos expresados sobre la superficie. También puede hacer referencia a los propios antígenos.

Unión específica: cuando se refiere a una opsonina (tal como un anticuerpo opsónico), se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de una proteína, péptido, o polisacárido diana en presencia de una población heterogénea de proteínas y otros agentes biológicos. Por tanto, en condiciones determinadas, un anticuerpo se une preferentemente a una proteína, péptido o polisacárido diana particular (tal como un antígeno presente sobre la superficie de un patógeno, por ejemplo polisacárido capsular bacteriano) y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas o polisacáridos presentes en la muestra o sujeto.

Identidad/similitud de secuencia: la identidad/similitud entre dos o más secuencias de ácido nucleico, o dos o más secuencias de aminoácidos, se expresa en términos de la identidad o similitud entre las secuencias. La identidad de secuencia se puede medir en términos de porcentaje de identidad; cuanto mayor sea el porcentaje, más idénticas serán las secuencias. Los homólogos u ortólogos de secuencias de ácido nucleico o aminoácidos tienen un grado relativamente elevado de identidad/similitud de secuencia cuando se alinean usando métodos convencionales.

Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Diversos programas y algoritmos de alineación se describen en: Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; Higgines y Sharp, Gene,

73:237 - 44, 1988; Higgins y Sharp, CABIOS 5:151 - 3, 1989; Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16:10881 - 90, 1988; Huang et al. Computer Appls. in the Biosciences 8, 155 - 65, 1992; y Pearson et al., Met. Mol. Bio. 24:307 - 31, 1994. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 - 10, 1990, presenta una consideración detallada de los métodos de alineación de secuencia y cálculos de homología.

La herramienta de búsqueda de alineación local básica del NCBI (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 - 10, 1990) está disponible en diversas fuentes, incluyendo el National Center for Biological Information (NCBI, National Library of Medicine, Edificio 38A, Sala 8N805, Bethesda, MD 20894) y en Internet, para su uso en conexión con los programas de análisis de secuencia blastp, blastn, blastx, tblastn, y tblastx. Blastn se usa para comparar secuencias de ácido nucleico, mientras que blastp se usa para comparar secuencias de aminoácidos. Se puede encontrar información adicional en el sitio web NCBI.

Una vez alineadas, la cantidad de coincidencias se determina contando el número de posiciones donde está presente un nucleótido o resto aminoacídico idéntico en ambas secuencias. El porcentaje de identidad de secuencia se determina dividiendo el número de coincidencias por la longitud de la secuencia expuesta en la secuencia identificada, o por una longitud articulada (tal como 100 nucleótidos o restos aminoacídicos consecutivos de una secuencia expuesta en una secuencia identificada), seguido por multiplicación del valor resultante por 100. Por ejemplo, una secuencia peptídica que tiene 1166 coincidencias cuando se alinea con una secuencia de ensayo que tiene 1554 nucleótidos es un 75,0 por ciento idéntica a la secuencia de ensayo ($1166 \div 1554 \times 100 = 75,0$). El valor de porcentaje de identidad de secuencia se redondea a la decena más cercana. Por ejemplo, 75,11, 75,12, 75,13, y 75,14 se redondean a la baja a 75,1, mientras que 75,15, 75,16, 75,17, 75,18, y 75,19 se redondean a la alta a 75,2. El valor de longitud será siempre un entero.

Cantidad terapéuticamente eficaz: una cantidad de una sustancia específica (por ejemplo péptido P4, anticuerpo opsonico, antibiótico y/o proteína del complemento) suficiente para conseguir un efecto deseado en un sujeto que se está tratando. Por ejemplo, ésta puede ser la cantidad necesaria para inhibir o tratar una infección por un patógeno, tal como una infección por un patógeno bacteriano. Cuando se administra a un sujeto, generalmente se usará una dosificación que conseguirá concentraciones en el tejido diana mostradas para conseguir un efecto *in vitro* deseado.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una sustancia, tal como péptido P4, anticuerpo opsonico y/o proteína del complemento se puede administrar en una única dosis, o en varias dosis, por ejemplo diariamente, durante un curso de tratamiento. Sin embargo, la cantidad eficaz de una composición dependerá del compuesto o péptido aplicado, el sujeto que se esté tratando, la gravedad y tipo de la afección, y el modo de administración de la composición. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de composición puede variar de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal.

Virus: un organismo infeccioso microscópico que se reproduce dentro de células vivas. Un virus consta esencialmente de un núcleo de ácido nucleico rodeado por una cubierta de proteína, y tiene la capacidad de replicarse solamente dentro de una célula viva. "Replicación viral" es la producción de virus adicional por la existencia de al menos uno ciclo vital del virus. Un virus puede subvertir las funciones normales de las células hospedadoras, causando que la célula se comporte de un modo determinado por los virus. Por ejemplo, una infección viral puede provocar que la célula produzca una citoquina, o que responda a una citoquina, cuando la célula no infectada normalmente lo hace. En algunos ejemplos, un virus es un patógeno. Ejemplos específicos de patógenos virales para los cuales se puede potenciar la opsonofagocitosis de acuerdo con los métodos descritos incluyen, sin limitación; Arenavirus (tal como virus Guanarito, virus Lassa, virus Junin, virus Machupo y Sabia), Arterivirus, Ronivirus, Astrovirus, Bunyavirus (tal como virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo y Hantavirus), Barnavirus, Birnavirus, Bornavirus (tal como virus de la enfermedad Borna), Bromovirus, Calicivirus, Chrysovirus, Coronavirus (tal como Coronavirus y SARS), Cystovirus, Closterovirus, Comovirus, Dicistrovirus, Flavivirus (tal como virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo occidental, virus de la Hepatitis C, y virus de la fiebre del Dengue), Filovirus (tal como virus Ébola y virus Marburg), Flexivirus, Hepevirus (tal como virus de la hepatitis E), adenovirus humanos (tal como adenovirus humanos A-F), astrovirus humanos, poliomavirus BK humanos, bocavirus humanos, coronavirus humano (tal como un coronavirus humano HKU1, NL63, y OC43), enterovirus humanos (tal como enterovirus humanos A-D), eritrovirus humano V9, virus espumosos humanos, herpesvirus humanos (tal como herpesvirus humano 1 (virus del herpes simple tipo 1), herpesvirus humano 2 (virus del herpes simple tipo 2), herpesvirus humano 3 (virus Varicella Zoster), herpesvirus humano 4 tipo 1 (virus de Epstein-Barr tipo 1), herpesvirus humano 4 tipo 2 (virus de Epstein-Barr tipo 2), herpesvirus humano 5 cepa AD169, herpesvirus humano 5 cepa Merlin, herpesvirus humano 6A, herpesvirus humano 6B, herpesvirus humano 7, herpesvirus humano 8 tipo M, herpesvirus humano 8 tipo P y Citomegalovirus humano), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (tal como VIH 1 y VIH 2), metapneumovirus humanos, papilomavirus humanos (tal como virus del papiloma humano-1, virus del papiloma humano-18, virus del papiloma humano-2, virus del papiloma humano-54, virus del papiloma humano-61, virus del papiloma humano-cand90, virus del papiloma humano RTRX7, virus del papiloma humano tipo 10, virus del papiloma humano tipo 101, virus del papiloma humano tipo 103, virus del papiloma humano tipo 107, virus del papiloma humano tipo 16, virus del papiloma humano tipo 24, virus del papiloma humano tipo 26, virus del papiloma humano tipo 32, virus del papiloma humano tipo 34, virus del papiloma humano tipo 4, virus del papiloma humano tipo 41, virus del papiloma humano tipo 48, virus del papiloma humano tipo 49, virus del papiloma humano tipo 5, virus del papiloma humano tipo 50, virus del papiloma humano tipo 53, virus del papiloma humano tipo 60, virus del

5 papiloma humano tipo 63, virus del papiloma humano tipo 6b, virus del papiloma humano tipo 7, virus del papiloma humano tipo 71, virus del papiloma humano tipo 9, virus del papiloma humano tipo 92, y virus del papiloma humano tipo 96), virus de parainfluenza humana (tal como virus de parainfluenza humana 1 - 3), parechovirus humanos, parvovirus humanos (tal como parvovirus humano 4 y parvovirus humano B19), virus sincitiales respiratorios humanos, rinovirus humanos (tal como rinovirus humano A y rinovirus humano B), espumaretrovirus humanos, virus linfotrópico-T humano (tal como virus linfotrópico-T humano 1 y virus linfotrópico-T humano 2), poliomavirus humano, Hipovirus, Levivirus, Luteovirus, virus de coriomeningitis linfocítica (LCM), Marnavirus, Narnavirus, Nidovirales, Nodavirus, Ortomixovirus (tal como virus de la influenza), Partitivirus, Paramixovirus (tal como virus del sarampión y virus de las paperas), Picomavirus (tal como poliovirus, el virus del resfriado común, y virus de la Hepatitis A), Potyvirus, Poxvirus (tal como Variola y viruela vacuna), Sequivirus, Reovirus (tal como Rotavirus), Rabdovirus (tal como virus de la rabia), Rabdovirus (tal como virus de la estomatitis vesicular, Tetravirus, Togavirus (tal como virus de la rubéola y virus del río Ross), Tombusvirus, Totivirus, Tymovirus, Norovirus, herpesvirus bovinos incluyendo virus del herpes bovino (BHV) y virus de la fiebre catarral maligna (MCFV), entre otros. En algunos ejemplos, una célula infectada con un virus se opsonofagocita.

15 *II. Resumen de varias realizaciones*

Esta descripción se refiere a péptidos P4 aislados para su uso en métodos para tratar, prevenir o inhibir la infección de patógenos en un sujeto potenciando la respuesta opsónica a patógenos y a composiciones para su uso en abordar un patógeno de interés para opsonofagocitosis. La opsonofagocitosis es la unión (u opsonización) de anticuerpos y el complemento o componentes del complemento al patógeno y la captación posterior del agente infeccioso por células efectoras mediante la unión de las células efectoras al complejo de anticuerpo/antígeno.

25 Durante una respuesta inmune protectora, se generan anticuerpos funcionales que se unen a los agentes infecciosos y también proporcionan un medio para su captación y eliminación por las células efectoras. Los anticuerpos funcionales (anticuerpos opsónicos) que se unen específicamente a un antígeno sobre la superficie de un patógeno de interés se pueden purificar y administrar a un sujeto para tratar y/o inhibir una infección en el sujeto por abordamiento del patógeno de interés para opsonización por las células efectoras del propio sujeto. Aunque dichas terapias parecen prometedoras, deben administrarse dosis normalmente grandes del anticuerpo opsónico para alcanzar el efecto deseado de eliminación del patógeno. Por tanto, existe la necesidad de métodos para potenciar la respuesta opsónica por anticuerpos opsónicos.

35 Para cumplir esta necesidad, en este documento se describen métodos para usar péptidos P4 para potenciar la respuesta opsónica a anticuerpos opsónicos por células efectoras cuando se administran junto con anticuerpos opsónicos que abordan patógenos de interés mediante unión específica a un antígeno sobre su superficie. Los péptidos P4 se obtiene de la cadena 7, α -hélice 12, y la cadena 8 de la proteína PsaA de *Streptococcus pneumoniae*, pero contienen mutaciones puntuales con relación a la secuencia nativa de la proteína PsaA para aumentar el punto isoelectrónico y potenciar la unión. El descubrimiento de que los péptidos P4 potencian la opsonización de patógenos por células efectoras, como se describe en este documento, fue particularmente sorprendente e inesperada considerando que los péptidos P4 se desarrollaron inicialmente para inhibir la internalización de *Streptococcus pneumoniae* por células nasofaríngeas (véase la publicación de patente internacional WO 2006/127020). Además, como se describe en este documento, también se ha descubierto que la coadministración de péptido P4 con antibióticos potencia sinérgicamente la eficacia de los antibióticos. A causa de este comportamiento sinérgico, es posible usar dosis inferiores de antibiótico cuando se combinan con péptido P4, mantenimiento aún al mismo tiempo la eficacia del antibiótico.

45 *A. Métodos de tratamiento*

Se describen métodos para potenciar la opsonofagocitosis de un patógeno de interés en un sujeto, por ejemplo, para potenciar la opsonofagocitosis de un patógeno de interés con el fin de inhibir y/o tratar una infección en un sujeto causada por el patógeno de interés. El patógeno de interés puede ser cualquiera de los patógenos bacterianos, virales o fúngicos analizados en el anterior sumario de términos. En ejemplos particulares, el método se usa para potenciar la opsonofagocitosis en un sujeto que está infectado con (o en riesgo de infectarse con) un patógeno, (tal como un patógeno viral, bacteriano o fúngico). En ejemplos particulares, el patógeno es un patógeno bacteriano, tal como *Streptococcus* (tal como *Streptococcus pneumoniae*), *Staphylococcus* (tal como *Staphylococcus aureus*), o *Meningococcus* (tal como *Neisseria meningitidis*). En algunos ejemplos, se selecciona un sujeto para tratamiento que tiene o está en riesgo de desarrollar una infección por un patógeno (tal como un patógeno viral, bacteriano o fúngico). En algunos ejemplos, se selecciona un sujeto que tiene o está en riesgo de una infección por *Streptococcus* (tal como una infección por *Streptococcus pneumoniae*). En algunos ejemplos, se selecciona un sujeto que tiene o está en riesgo de una infección por *Staphylococcus* (tal como una infección por *Staphylococcus aureus*). En algunos ejemplos, se selecciona un sujeto que tiene o está en riesgo de una infección por *Meningococcus* (tal como una infección por *Neisseria meningitidis*). En algunos ejemplos, un sujeto seleccionado para tratamiento no está infectado con un patógeno que expresa proteína adhesina A de superficie (PsaA) de neumococos, por ejemplo el sujeto seleccionado no está infectado con *Streptococcus pneumoniae*. Los métodos incluyen administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido P4 aislado que incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica, como al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 99

%, al menos un 99 % idéntica o incluso un 100 % idéntica, a la secuencia de aminoácidos expuesta como LFVESSVKRRPMKTVSQDTNIPIYAQIF (SEC ID N° 1), y opcionalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos opsónicos aislado o un fragmento de los mismos que se unen específicamente a un antígeno presente sobre la superficie del patógeno de interés (por ejemplo un patógeno bacteriano, viral o fúngico de interés enumerado anteriormente). En algunos ejemplos, un péptido P4 es de entre aproximadamente 27 y aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, tal como de no más de 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, ó 200 aminoácidos de longitud o aún más largo, por ejemplo de 27 - 50, 40 - 60, 50 - 70, 60 - 80, 70 - 90, 80 - 100, 90 - 110, 100 - 120, 110 - 130, 120 - 140, 130 - 140, 140 - 160, 150 - 170, 160 - 180, 170 - 190, ó 180 - 200 aminoácidos de longitud. En algunos ejemplos, un péptido P4 consta de la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N° 1. En algunos ejemplos, a un sujeto se le administra péptido P4. En algunos ejemplos, a un sujeto se le administra péptido P4 junto con uno o más anticuerpos opsónicos aislados o un fragmento de los mismos que se unen específicamente a un antígeno presente sobre la superficie del patógeno de interés. En algunos ejemplos, se le administra péptido P4 a un sujeto que tiene células infectadas con un virus, por ejemplo para potenciar la opsonofagocitosis de las células que expresan proteínas de superficie celular del patógeno viral de interés. En algunos ejemplos, el péptido P4 incluye una secuencia de aminoácidos que tiene no más de uno o dos cambios de aminoácido a partir de la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N° 1, por ejemplo sustituciones conservativas. Puede utilizarse cambios en la secuencia de aminoácidos que aún harán al péptido resultante capaz de potenciar la opsonofagocitosis de un patógeno de interés, y se contemplan por ejemplo por sustitución conservativa. También se contemplan proteínas de fusión que incluyen un péptido P4 fusionado a una secuencia de aminoácidos heteróloga. En algunos ejemplos, el péptido P4 está lipidado, por ejemplo lipidado con un ácido palmítico y similares. Se describen composiciones farmacéuticas ejemplares a continuación en la sección B. Se contemplan diversos modos de administración de las composiciones farmacéuticas de esta descripción (véase la siguiente sección B).

La administración del péptido P4 potencia las capacidad del sujeto (y específicamente la capacidad de las células efectoras del sujeto) de opsonofagocitar el patógeno de interés que está unido específicamente por un anticuerpo opsónico o fragmento del mismo, por ejemplo un anticuerpo opsónico producido por el sujeto (por ejemplo un sujeto infectado con un patógeno) y/o un anticuerpo opsónico aislado administrado al sujeto. En algunos ejemplos, se administra al sujeto un anticuerpo opsónico o fragmento del mismo y el péptido P4. La administración de un anticuerpo opsónico o fragmento del mismo y el péptido P4 puede suceder en cualquier orden o incluso simultáneamente, por ejemplo por co-administración como una preparación farmacéutica única, o como preparaciones múltiples, tal como una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido P4 y una composición que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo opsónico o fragmento del mismo que se une específicamente a un patógeno de interés (o incluso múltiples anticuerpos opsónicos, por ejemplo múltiples anticuerpos opsónicos que se unen cada uno específicamente a un único patógeno de interés, o múltiples anticuerpos opsónicos donde cada anticuerpo opsónico se une específicamente a un diferente patógeno de interés, o múltiples serotipos de un único patógeno de interés, o cualquier combinación de los mismos) o incluso una composición que contiene tanto una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido P4 como una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo opsónico o fragmento del mismo (o múltiples anticuerpos opsónicos).

Como se describe en este documento, la administración del péptido P4 junto con un antibiótico aumenta la eficacia del antibiótico, por ejemplo permitiendo usar una dosis inferior y/o aumentando la eliminación bacteriana. En general, puede usarse cualquier antibiótico con los métodos descritos. Ejemplos de antibióticos que se pueden usar incluyen, aunque sin limitación, aminoglucósidos (tales como amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina, y paromomicina); ansamicinas (tales como geldanamicina, y herbimicina); carbacefems (tales como loracarbef, ertapenem, doripenem, imipenem/cilastatina, y meropenem); cefalosporinas (tales como cefadroxilo, cefazolina, cefalotina, cefalexina, cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozilo, cefuroxima, cefixima, cefdinir, cefditoren, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftriaxona, cefepima, y ceftobiprol); glucopéptidos (tales como teicoplanina y vancomicina); macrólidos (tales como azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina, y espectinomicina); monobactamas (tales como aztreonam); penicilinas (tales como amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, meticilina, nafcilina, oxacilina, penicilina, piperacilina, y ticarcilina); polipéptidos (tales como bacitracina, colistina, y polimixina b); quinolonas (tales como ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, trovafloxacina, grepafloxacina, y esparfloxacina); sulfonamidas (tales como mafenida, prontosil (arcaico), sulfacetamida, sulfametizol, sulfanilimida (arcaico), sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim, y trimetoprim-sulfametoxazol); tetraciclinas (tales como demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, y tetraciclina); y otros (tales como arsfenammina, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, etambutol, fosfomicina, ácido fusídico, furazolidona, isoniazid, linezolid, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoina, platensimicina, pirazinamida, quinupristina/dalfopristina, rifampicina, tiamfenicol, y tinidazol). En algunos ejemplos, se administra un antibiótico (o más de un antibiótico) y el péptido P4 a un sujeto. La administración de un antibiótico o fragmento del mismo y el péptido P4 puede suceder en cualquier orden o incluso simultáneamente, por ejemplo por co-administración como una preparación farmacéutica única, o como preparaciones múltiples, tal como una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido P4 y una composición que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico que es específico para un patógeno de interés. En algunos ejemplos, se administra un anticuerpo

opsónico o fragmento del mismo, péptido P4 y antibiótico a un sujeto. La administración de un anticuerpo opsónico o fragmento del mismo, el péptido P4 y el antibiótico puede suceder en cualquier orden o incluso simultáneamente, por ejemplo por co-administración como una preparación farmacéutica única, o como preparaciones múltiples, tal como una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido P4, una composición que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico específico para un patógeno de interés, y una composición que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo opsónico o fragmento del mismo que se une específicamente a un patógeno de interés (o incluso múltiples anticuerpos opsónicos, por ejemplo múltiples anticuerpos opsónicos que se unen cada uno específicamente a un único patógeno de interés, o múltiples anticuerpos opsónicos donde cada anticuerpo opsónico se une específicamente a un diferente patógeno de interés, o múltiples serotipos de un único patógeno de interés, o cualquier combinación de los mismos) o incluso una composición que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido P4 y una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo opsónico o fragmento del mismo (o múltiples anticuerpos opsónicos) y una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico específico para un patógeno de interés.

Las proteínas del complemento y fragmentos de las mismas ayudan a la opsonofagocitosis de patógenos uniéndose a anticuerpos opsónicos y facilitando la opsonización por células efectoras. Por tanto, en algunos ejemplos, al sujeto también se le administra una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína del complemento aislada o fragmento de la misma, tal como uno o más de C3a, C3b, iC3b, C3d, C4b, o C5a. En algunos ejemplos se selecciona un sujeto que tiene un complemento defectuoso para la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína del complemento aislada o fragmento de la misma. En ciertos ejemplos, la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido P4 aislado se administra por vía intranasal y/o vía intravenosa. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo opsónico o fragmento del mismo se administra por vía intranasal y/o vía intravenosa. En algunos ejemplos, la cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína del complemento aislada o un fragmento de la misma, tal como uno o más de C3a, C3b, iC3b, C3d, C4b, o C5a, se administra por vía intranasal y/o vía intravenosa.

Como los péptidos P4 no son específicos para ningún patógeno único, los péptidos P4 y composiciones terapéuticas de esta descripción pueden formularse para potenciar la opsonofagocitosis de cualquier patógeno de interés proporcionando un anticuerpo opsónico o fragmento del mismo que aborde cualquier patógeno de interés, por ejemplo proporcionando un anticuerpo opsónico o un fragmento del mismo (tal como una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo opsónico o un fragmento del mismo) que se une específicamente a un antígeno presente sobre la superficie del patógeno de interés, o proporcionando péptido P4 a un sujeto que está produciendo anticuerpos opsónicos, por ejemplo un sujeto que está infectado, o se ha infectado con un patógeno. Los métodos de producción de anticuerpos opsónicos se dan a continuación en la sección C. En algunos ejemplos, el patógeno de interés es un patógeno bacteriano y se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo opsónico que se une específicamente al patógeno bacteriano. En ciertos ejemplos, el patógeno de interés es *Streptococcus pneumoniae*. En otros ejemplos, el patógeno de interés es *Neisseria meningitidis*. En otros ejemplos más, el patógeno de interés es *Staphylococcus aureus*, tal como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). En algunos ejemplos, el patógeno de interés es un patógeno viral y se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo opsónico que se une específicamente al patógeno viral o a una célula infectada con el patógeno viral. En algunos ejemplos, el patógeno de interés es un patógeno fúngico y se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo opsónico que se une específicamente al patógeno fúngico.

45 B. Composiciones terapéuticas

El péptido P4 se puede administrar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* a una célula o sujeto. Es deseable preparar péptidos P4 como una composición farmacéutica adecuada para la aplicación pretendida, por ejemplo para inhibir o tratar una infección patogénica, tal como una infección por un patógeno analizado en el anterior sumario de términos. Por consiguiente, se incluyen en este documento métodos para preparar un medicamento o composición farmacéutica que contenga un péptido P4 (y en algunos casos un anticuerpo opsónico o un fragmento del mismo, antibiótico, y/o proteína del complemento o un fragmento de la misma). Los péptidos P4 pueden prepararse para administración en solitario o con otros ingredientes activos, tales como antibióticos (por ejemplo los antibióticos descritos en la sección A anteriormente) y/u otras proteínas, tal como con un anticuerpo opsónico, antibiótico (o incluso múltiples antibióticos) y/o proteína del complemento (o incluso múltiples anticuerpos opsónicos que son específicos para diferentes patógenos (células infectadas con patógenos) y/o proteínas del complemento, o fragmentos de las mismas). En algunos ejemplos, una composición terapéutica incluye péptido P4. En algunos ejemplos, una composición terapéutica incluye un anticuerpo opsónico. En algunos ejemplos, una composición terapéutica incluye un antibiótico. En algunos ejemplos, una composición terapéutica incluye un anticuerpo opsónico y un péptido P4. En algunos ejemplos, una composición terapéutica incluye un anticuerpo opsónico, un péptido P4 y un antibiótico. En algunos ejemplos, una composición terapéutica incluye una proteína del complemento o fragmento de la misma. En algunos ejemplos, una composición terapéutica incluye una proteína del complemento o fragmento de la misma y un péptido P4. En algunos ejemplos, una composición terapéutica incluye una proteína del complemento o fragmento de la misma, un antibiótico y un péptido P4. En algunos ejemplos, una composición terapéutica incluye una proteína del complemento o fragmento de la misma y un

anticuerpo opsónico. Cuando se administra a un sujeto péptido P4 y anticuerpo opsónico, y/o antibiótico y/o proteína del complemento, la administración puede ser concurrente o secuencial. La administración secuencial del péptido P4 y anticuerpo opsónico y/o antibiótico y/o proteína del complemento se puede separar por cualquiera cantidad de tiempo siempre que la administración de péptido P4 potencie la actividad opsónica del anticuerpo opsónico. También se contemplan múltiples administraciones de las composiciones descritas en este documento.

En algunas realizaciones, una composición terapéutica descrita incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido P4 aislado que incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica, tal como al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o incluso un 100 % idéntica a la expuesta como SEC ID N° 1 y opcionalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos opsónicos aislados o un fragmento de los mismos que se unen específicamente a un antígeno presente sobre la superficie de un patógeno de interés. En algunos ejemplos, la composición terapéutica también incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico, o incluso más de un antibiótico. En algunos ejemplos, la composición terapéutica también incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína del complemento aislada o fragmento de la misma, tal como uno o más de C3a, C3b, iC3b, C3d, C4b, o C5a.

Normalmente, la preparación de una composición farmacéutica (para su uso como un medicamento o en la fabricación de un medicamento) supone preparar una composición farmacéutica que esté esencialmente libre de pirógenos, así como de cualquier otra impureza que podría ser perjudicial para seres humanos o animales. Normalmente, la composición farmacéutica contiene sales y tampones apropiados para volver a los componentes de la composición estables y permitir que el péptido P4 interactúe con las células de un sujeto.

La administración de composiciones terapéuticas puede ser por cualquier vía común siempre que el tejido diana esté disponible mediante esa vía. Esto incluye administración oral, nasal (tal como intranasal), ocular, bucal, enteral, intravital, o a través de otra mucosa (tal como rectal o vaginal) o tópica. Como alternativa, la administración será por vía de inyección ortotópica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, parenteral, intraperitoneal, o intravenosa. Dichas composiciones farmacéuticas se administran habitualmente como composiciones farmacéuticamente aceptables que incluyen vehículos, tampones u otros excipientes fisiológicamente aceptables.

Las composiciones terapéuticas pueden proporcionarse como composiciones parenterales, tales como para inyección o infusión. Dichas composiciones se formulan generalmente mezclando péptido P4 al grado deseado de pureza, en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión, o emulsión), con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo uno que sea no tóxico para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas y sea compatible con otros ingredientes de la formulación. Además, los péptidos P4 (y/o anticuerpos opsónicos, y/o antibiótico, y/o proteína del complemento o fragmentos de la misma) se pueden suspender en un vehículo acuoso, por ejemplo, en una solución de tampón isotónico a un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 8,0, preferiblemente a un pH de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 7,4, de 3,5 a 6,0, o de 3,5 a aproximadamente 5,0. Los tampones útiles incluyen tampones citrato sódico-ácido cítrico y fosfato sódico-ácido fosfórico, y acetato sódico/ácido acético. El péptido P4, opcionalmente junto con excipientes, anticuerpo opsónico, antibiótico y/o proteína del complemento o fragmentos de la misma, pueden estar en forma de un liofilizado y se puede preparar en una solución antes de administración parenteral mediante la adición de disolventes adecuados. También pueden usarse soluciones tales como las que se usan, por ejemplo, para administración parenteral como soluciones de infusión.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir una cantidad eficaz (tal como una cantidad terapéuticamente eficaz) de péptido P4, proteína del complemento, antibiótico, y/o anticuerpos opsónicos (por ejemplo, disueltos o suspendidos) en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables y/o excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª edición (1975).

La naturaleza del vehículo dependerá del el modo particular de administración que se esté empleando. Por ejemplo, las formulaciones parenterales habitualmente contienen fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (tales como formas de polvo, píldora, comprimido, o cápsula), los vehículos sólidos no tóxico convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además, las composiciones farmacéuticas a administrarse pueden contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes, y agentes tamponantes del pH y similares, por ejemplo acetato sódico o monolaurato de sorbitán.

Como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas. También pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios en las composiciones. Por ejemplo, ciertas composiciones

farmacéuticas pueden incluir péptido P4 en agua, mezclada con un tensioactivo adecuado, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

5 Formulaciones adicionales son adecuadas para administración oral. Las formulaciones orales pueden incluir excipientes tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Las composiciones (medicamentos) normalmente adoptan la forma de soluciones, suspensiones, aerosoles o polvos. Pueden encontrarse formulaciones ejemplares la publicación de patente de Estados Unidos N° 20020031527. Cuando la vía es tópica, la forma puede ser una crema, pomada, bálsamo o pulverización.

15 Los sujetos típicos pretendidos para tratamiento con las composiciones farmacéuticas y métodos de la presente descripción incluyen seres humanos, así como primates no humanos y otros animales. Para identificar sujetos para profilaxis o tratamiento de acuerdo con los métodos de la descripción, se emplean métodos de selección aceptados para determinar factores de riesgo asociados con una enfermedad o afección diana o sospechada (por ejemplo, una infección asociada con un patógeno particular de interés) o para determinar el estado de una enfermedad o afección existente en un sujeto. Estos métodos de selección incluyen, por ejemplo, métodos de diagnóstico, tales como diversos métodos ELISA y otros de inmunoensayo, que están disponibles y son bien conocidos en la técnica para detectar y/o caracterizar marcadores asociados a enfermedad. Estos y otros métodos rutinarios permiten al médico seleccionar pacientes en necesidad de terapia usando los métodos y composiciones farmacéuticas de la descripción.

25 Una cantidad eficaz de la composición farmacéutica se determina basándose en el objetivo pretendido, por ejemplo para inhibir y/o tratar una infección patogénica de un sujeto humano o no humano. La administración de las composiciones farmacéuticas de la revelación puede ser con fines profilácticos o terapéuticos. Cuando se proporciona de forma profiláctica, la composición farmacéutica se proporciona con antelación a cualquier síntoma. La administración profiláctica del compuesto sirve para evitar o mejorar cualquiera proceso posterior de enfermedad. Cuando se proporciona de forma terapéutica, el compuesto se proporciona al aparecer (o poco después de ello) de un síntoma de enfermedad o infección.

35 Para fines profilácticos y terapéuticos, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto en un suministro de un único bolo, mediante suministro continuo (por ejemplo, suministro continuo transdérmico, a la mucosa o intravenoso) durante un periodo de tiempo prolongado, o en un protocolo de administración repetida (por ejemplo, mediante un protocolo de administración repetida cada hora, cada día o cada semana). La dosificación terapéuticamente eficaz del compuesto se puede proporcionar como dosis repetidas en una régimen de profilaxis o tratamiento prolongado que producirá resultados clínicamente significativos para aliviar uno o más síntomas o condiciones detectables asociadas con una enfermedad o afección diana expuesta en este documento. La determinación de las dosificaciones eficaces en este contexto se basa normalmente en estudios con modelos animales seguidos por ensayos clínicos en seres humanos y está guiada por protocolos de administración que reducen significativamente la aparición o la gravedad de los síntomas o condiciones de la enfermedad diana en el sujeto. Modelos adecuados a este respecto incluyen, por ejemplo, sujetos de modelo animal murinos, de rata, porcinos, felinos, primates no humanos, y otros aceptados conocidos en la técnica. Como alternativa, las dosificaciones eficaces se pueden determinar usando modelos *in vitro* (por ejemplo, ensayos inmunológicos e histopatológicos). Usando dichos modelos, se requieren solamente cálculos y ajustes ordinarios para determinar una concentración y dosis apropiadas para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido P4 (por ejemplo, cantidades que son eficaces para aliviar uno o más síntomas de una infección diana).

50 La dosis apropiada variará dependiendo de las características del sujeto, por ejemplo, si el sujeto es un ser humano o no humano, la edad, peso, y otras consideraciones de salud pertenecientes a la condición o estado del sujeto, el modo, vía de administración, y cantidad de dosis, y si la composición farmacéutica incluye péptido P4 en solitario o junto con un anticuerpo opsónico y/o antibiótico y/o proteína del complemento, tiempo y vía de administración, otros fármacos o tratamientos que se estén administrando al mismo tiempo, así como la farmacología específica de las composiciones terapéuticas para provocar la actividad o respuesta biológica deseada en el sujeto. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar una respuesta profiláctica o terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en que cualquier efecto secundario tóxico o perjudicial del compuesto y/u otro agente biológicamente activo está compensado en términos clínicos por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Un intervalo no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido P4 y/o otro agente biológicamente activo en los métodos y formulaciones de la descripción es de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, tal como de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal.

65 Las composiciones terapéuticas que incluyen un agente terapéutico descrito pueden suministrarse mediante una bomba (véase Langer, *supra*; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201, 1987; Buchwald et al., Surgery 88:507, 1980; Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574, 1989) o por infusiones subcutáneas continuas, por ejemplo, usando

una mini-bomba. También puede emplearse una solución en bolsa intravenoso. Un factor en la selección de la dosis apropiada es el resultado obtenido, medido por los métodos aquí descritos, que sean considerados apropiados por el facultativo. Se analizan otros sistemas de liberación controlada en Langer (Science 249:1527 - 33, 1990).

5 En un ejemplo, se implanta una bomba (por ejemplo véase las Patentes de Estados Unidos N° 6.436.091; 5.939.380; y 5.993.414). Los dispositivos implantables de infusión de fármacos se usan para proporcionar a los pacientes una dosificación o infusión constante y a largo plazo de un agente terapéutico. Dicho dispositivo puede clasificarse como activo o pasivo.

10 Los dispositivos de infusión activa o programable de fármacos proporcionan una bomba o sistema de medición para suministrar el agente en el sistema del paciente. Un ejemplo de dicho dispositivo de infusión activa actualmente disponible es la bomba programable Medtronic SYNCHROMED™. Los dispositivos de infusión pasiva, en contraste, no proporcionan una bomba, sino que más bien dependen de un depósito presurizado de fármaco para suministrar el agente de interés. Un ejemplo de dicho dispositivo incluye el Medtronic ISOMED™.

15 En ejemplos particulares, las composiciones terapéuticas que incluyen un agente terapéutico descrito se administran mediante sistemas de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de sistemas de liberación sostenida incluyen materiales poliméricos adecuados (tales como matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas), materiales hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, y derivados escasamente solubles (tales como, por ejemplo, una sal escasamente soluble). Las composiciones de liberación sostenida pueden administrarse por vía oral, parenteral, intracisternal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, pomadas, geles, gotas o parche transdérmico), o como una pulverización oral o nasal. Las matrices de liberación sostenida incluyen polilactidas (patente de Estados Unidos N° 3.773.919, documento EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers 22:547 - 556, 1983), poli(2-hidroxietil metacrilato) (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167 - 277, 1981; Langer, Chem. Tech. 12:98 - 105, 1982), etilen vinil acetato (Langer *et al.*, *Id.*) o ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988).

30 Pueden usarse polímeros para liberación controlada por iones. Se conocen en la técnica diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para su uso en el suministro controlado de fármacos (Langer, Accounts Chem. Res. 26:537, 1993). Por ejemplo, el copolímero de bloque, poloxámero 407 existe como un líquido viscoso aunque móvil a temperaturas bajas pero forma un gel semisólido a temperatura corporal. Se ha demostrado que es un vehículo eficaz para formulación y suministro sostenido de interleuquina-2 recombinante y ureasa (Johnston et al., Pharm. Res. 9:425, 1992; y Pec, J. Parent. Sci. Tech. 44(2):58, 1990). Como alternativa, se ha usado hidroxiapatita como microvehículo para liberación controlada de proteínas (Ijntema et al., Int. J. Pharm. 112:215, 1994). En otro aspecto más, se usan liposomas para liberación controlada así como direccionamiento de fármacos del fármaco encapsulado en el lípido (Betageri et al., Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, 1993). Se conocen numerosos sistemas adicionales para suministro controlado de proteínas terapéuticas (por ejemplo, patente de Estados Unidos N° 5.055.303; patente de Estados Unidos N° 5.188.837; patente de Estados Unidos N° 4.235.871; patente de Estados Unidos N° 4.501.728; patente de Estados Unidos N° 4.837.028; patente de Estados Unidos N° 4.957.735; y patente de Estados Unidos N° 5.019.369; patente de Estados Unidos N° 5.055.303; patente de Estados Unidos N° 5.514.670; patente de Estados Unidos N° 5.413.797; patente de Estados Unidos N° 5.268.164; patente de Estados Unidos N° 5.004.697; patente de Estados Unidos N° 4.902.505; patente de Estados Unidos N° 5.506.206; patente de Estados Unidos N° 5.271.961; patente de Estados Unidos N° 5.254.342; y patente de Estados Unidos N° 5.534.496).

50 Las composiciones farmacéuticas (medicamentos) pueden prepararse para su uso en regímenes profilácticos y administrarse a sujetos humanos o no humanos para protegerlos contra infección por un patógeno (o una pluralidad de patógenos). Por tanto, las composiciones farmacéuticas normalmente contienen una cantidad farmacéuticamente eficaz de péptido P4 y opcionalmente una cantidad farmacéuticamente eficaz de anticuerpo opsónico o un fragmento del mismo, y/o antibiótico y/o proteína del complemento o un fragmento de la misma. En algunos casos, las composiciones se administran tras la infección, por ejemplo para tratar la infección y aumentar la eliminación del patógeno, en dichas aplicaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de una composición usada para conseguir un efecto deseado en un sujeto. Por ejemplo, esto puede ser la cantidad de la composición necesaria para inhibir la infección por un patógeno, para aumentar la eliminación del patógeno en el sujeto o para evitar o alterar de forma medible los síntomas visibles de infección por un patógeno en un sujeto. Cuando se administra a un sujeto, generalmente se usará una dosificación que conseguirá concentraciones en el tejido diana que han demostrado conseguir un efecto *in vitro* o *in vivo*.

60 C. Anticuerpos opsónicos

Un inmunógeno, tal como un polisacárido inmunogénico o un polipéptido inmunogénico (por ejemplo un polisacárido inmunogénico o un péptido inmunogénico derivado de un patógeno, tal como un patógeno viral, bacteriano, o fúngico, por ejemplo los patógenos virales, bacterianos, o fúngicos enumerados anteriormente) o un fragmento o variante conservativa del mismo puede usarse para producir anticuerpos opsónicos que sean inmunorreactivos o se

unan a un epítopo sobre la superficie de un patógeno, por ejemplo se unan a antígenos particulados y induzcan la opsonofagocitosis del patógeno diana por las células efectoras. Se incluyen anticuerpos opsónicos policlonales, anticuerpos que constan esencialmente de anticuerpos monoclonales opsónicos combinadas con diferentes especificidades epitópicas, así como preparaciones de distintos anticuerpos opsónicos monoclonales.

La preparación de anticuerpos policlonales es bien conocida para los especialistas en la técnica. Véase, por ejemplo, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera", en *Immunochemical Protocols* páginas 1 - 5, Manson, ed., Humana Press 1992; Coligan et al., "Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats, Mice and Hamsters", en: *Current Protocols in Immunology*, sección 2.4.1, 1992.

La preparación de anticuerpos monoclonales igualmente es convencional. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256:495, 1975; Coligan *et al.*, secciones 2.5.1 - 2.6.7; y Harlow et al., en: *Antibodies: a Laboratory Manual*, página 726, Cold Spring Harbor Pub., 1988. En resumen, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales inyectando a ratones una composición que comprende un antígeno (por ejemplo un antígeno derivado de un patógeno), verificando la presencia de producción de anticuerpos retirando una muestra de suero, retirando el bazo para obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando clones positivos que producen anticuerpos contra el antígeno, y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse y purificarse de cultivos de hibridoma mediante diversas técnicas de bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con proteína-A Sepharose, cromatografía por exclusión de tamaño, y cromatografía de intercambio iónico. Véase, por ejemplo, Coligan *et al.*, secciones 2.7.1 - 2.7.12 y secciones 2.9.1 - 2.9.3; Barnes et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, páginas 79 - 104, Humana Press, 1992.

Los métodos de multiplicación *in vitro* e *in vivo* de anticuerpos monoclonales son bien conocidos para los especialistas en la técnica. La multiplicación *in vitro* puede realizarse en medios de cultivo adecuados tales como medio de Eagle modificado por Dulbecco o medio RPMI 1640, opcionalmente suplementado por un suero de mamífero tal como suero de ternera fetal o elementos traza y suplementos de mantenimiento del crecimiento tales como células de exudado peritoneal de ratón normal, células esplénicas, timocitos o macrófagos de médula ósea. La producción *in vitro* proporciona preparaciones de anticuerpo relativamente puras y permite el aumento a escala para producir grandes cantidades de los anticuerpos deseados. El cultivo de hibridoma a gran escala puede realizarse por cultivo en suspensión homogénea en un reactor de ascenso por aire, en un reactor de agitación continua, o en cultivo celular inmovilizado o atrapado. La multiplicación *in vivo* puede realizarse inyectando clones celulares en mamíferos histocompatibles con las células parentales, por ejemplo, ratones singénicos, para provocar el crecimiento de tumores productores de anticuerpo. Opcionalmente, los animales se sensibilizan con un hidrocarburo, especialmente aceites tales como pristano (tetrametilpentadecano) antes de la inyección. Después de una a tres semanas, se recupera el anticuerpo monoclonal deseado del fluido corporal del animal.

Los anticuerpos también se pueden obtener de anticuerpos de primate subhumanos. Pueden encontrarse técnicas generales para crear anticuerpos terapéuticamente útiles en babuinos, por ejemplo, en el documento WO 91/11465, 1991, y Losman et al., *Int. J. Cancer* 46:310, 1990.

Como alternativa, puede obtenerse un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido derivado de un patógeno a partir de un anticuerpo monoclonal humanizado. Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen transfiriendo regiones determinantes de complementariedad de ratón de cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón a un dominio de variable humano, y después sustituyendo los restos humanos en las regiones flanqueantes de los equivalentes murinos. El uso de componentes de anticuerpo derivados de anticuerpos monoclonales humanizados obvia los problemas potenciales asociados con la inmunogenicidad de regiones constantes murinas. Se describen técnicas generales para clonar dominios variables de inmunoglobulina murina, por ejemplo, por Orlandi et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 86:3833, 1989. Se describen técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados, por ejemplo, por Jones et al., *Nature* 321:522, 1986; Riechmann et al., *Nature* 332:323, 1988; Verhoeyen et al., *Science* 239:1534, 1988; Carter et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 89:4285, 1992; Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12:437, 1992; y Singer et al., *J. Immunol.* 150:2844, 1993.

Los anticuerpos pueden obtenerse de fragmentos de anticuerpos humanos aislados de una biblioteca combinatoria de inmunoglobulinas. Véase, por ejemplo, Barbas et al., en: *Methods: a Companion to Method in Enzymology*, Vol. 2, página 119, 1991; Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.* 12:433, 1994. Los vectores de clonación y expresión que son útiles para producir una biblioteca de fagos de inmunoglobulinas humanas se pueden obtener, por ejemplo, en STRATAGENE® Cloning Systems (La Jolla, CA).

Además, los anticuerpos pueden obtenerse de un anticuerpo monoclonal humano. Dichos anticuerpos se obtienen de ratones transgénicos que se han "modificado por ingeniería" para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a una exposición antigénica. En esta técnica, se introducen elementos de los loci de cadena pesada y ligera humanas en cepas de ratones derivados de líneas de células madre embrionarias que contienen alteraciones dirigidas de los loci endógenos de cadena de pesada y ligera. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, y los ratones pueden usarse para producir hibridomas de secretores de anticuerpos humanos. Se describen métodos para obtener anticuerpos humanos de ratones

transgénicos por Green et al., *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg et al., *Nature* 368:856, 1994; y Taylor et al., *Int. Immunol.* 6:579, 1994.

Los anticuerpos incluyen moléculas intactas así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂, y Fv que son capaces de unirse al determinante epitópico. Los métodos para preparar estos fragmentos son conocidos en la técnica. (Véase por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988). Un epítipo es cualquier determinante antigénico sobre un antígeno al cual se une el parátipo de un anticuerpo. Los determinantes epitópicos habitualmente constan de agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en *E. coli* del ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos de anticuerpo por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento de 5S indicado F(ab')₂. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' de 3,5S. Como alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos monovalentes Fab' y un fragmento Fc directamente (véase la patente de Estados Unidos N° 4.036.945 y la patente de Estados Unidos N° 4.331.647; Nisonhoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230, 1960; Porter, *Biochem. J.* 73:119, 1959; Edelman et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 1, página 422, Academic Press, 1967; y Coligan *et al.* en las secciones 2.8.1 - 2.8.10 y 2.10.1 - 2.10.4).

También pueden usarse otros métodos para escindir anticuerpos, tales como separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena ligera-pesada, escisión adicional de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas, o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que se reconoce por el anticuerpo intacto.

Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L. Esta asociación puede ser no covalente (Inbar et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 69:2659, 1972). Como alternativa, las cadenas variables pueden unirse por enlace disulfuro intermolecular o reticularse por agentes químicos tales como glutaraldehído. Véase, por ejemplo, Sandhu, *supra*. Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas por un enlazador peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de una única cadena (sFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que es después se introduce en una célula hospedadora tal como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador uniendo los dos dominios V. Los métodos para producir sFv son conocidos en la técnica (véase Whitlow et al., *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, página 97, 1991; Bir et al., *Science* 242:423, 1988; patente de Estados Unidos N° 4.946.778; Pack et al., *Bio/Technology* 11:1271, 1993; y Sandhu, *supra*).

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de complementariedad (CDR). Los péptidos CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") pueden obtenerse construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región de variable a partir de ARN de células productoras de anticuerpo (Larrick et al., *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, página 106, 1991).

Los anticuerpos pueden prepararse usando un polipéptido intacto, fragmentos que contienen péptidos pequeños o polisacáridos de interés como antígeno de inmunización. Un polipéptido o un péptido usado para inmunizar un animal puede obtenerse de un polipéptido sustancialmente purificado producido en células hospedadoras, ADNc traducido *in vitro*, o síntesis química, que puede conjugarse con una proteína vehículo, si se desea. Dichos vehículos usados comúnmente que se acoplan químicamente al péptido incluyen hemocianina de lapa californiana (KLH), tiroglobulina, albúmina sérica bovina (BSA), y toxoide tetánico. El péptido acoplado se usa después para inmunizar el animal (por ejemplo, un ratón, una rata, o un conejo).

Los anticuerpos policlonales o monoclonales pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, por unión a y elución desde un matriz en la cual está unido el polipéptido o un péptido contra el cual se crearon los anticuerpos. Los especialistas en la técnica conocerán diversas técnicas comunes en las técnicas de inmunología para purificación y/o concentración de anticuerpos policlonales, así como anticuerpos monoclonales (véase por ejemplo, Coligan et al., unidad 9, *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991).

También es posible usar la tecnología anti-idiotipo para producir anticuerpos monoclonales, que imitan un epítipo. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-idiotipo creado contra un primer anticuerpo monoclonal tendrá un dominio de unión en la región hipervariable que es la "imagen" del epítipo unido por el primer anticuerpo monoclonal.

Los anticuerpos pueden prepararse por técnicas de clonación. Ejemplos de técnicas apropiadas de clonación y secuenciación, e instrucciones suficientes para dirigir a los especialistas a través de muchos ejercicios de clonación se hallan en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Ed.), Vol. 1 - 3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Berger y Kimmel (eds.), *Guide to Molecular Cloning Techniques*, Academic Press, Inc., San Diego CA (1987), o Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley-Interscience, NY (1987). La información de los productos procedente de los fabricantes de reactivos biológicos y equipos experimentales también proporciona información útil. Dichos fabricantes incluyen la SIGMA Chemical company (Saint Louis, MO), R&D Systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH® laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), INVITROGEN™ (San Diego, CA), y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como muchas otras fuentes comerciales conocidas para los especialistas.

Un antígeno diana sustancialmente puro derivado de un patógeno adecuado para su uso como inmunógeno para producir anticuerpos opsonizantes se aísla por purificación o expresión recombinante (véase la sección D). La concentración de proteína en la preparación final se ajusta, por ejemplo, por concentración en un dispositivo de filtro Amicon, hasta el nivel de unos pocos microgramos por mililitro. Después puede prepararse el anticuerpo monoclonal o policlonal contra la proteína como se describe por Harlow y Lane (*Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press. 1988).

Como alternativa, los anticuerpos se pueden crear contra un péptido sintético sintetizado en un sintetizador de péptidos disponible en el mercado basándose en la secuencia predicha o conocida de aminoácidos del polipéptido diana o receptor de internalización (Harlow y Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press. 1988).

Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar y purificar a partir de cultivos de hibridoma por diversas técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con proteína-A Sepharose, cromatografía por exclusión de tamaño, y cromatografía de intercambio iónico. Véase, por ejemplo, Coligan *et al.*, secciones 2.7.1 - 2.7.12 y secciones 2.9.1 - 2.9.3; Barnes et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, páginas 79 - 104, Humana Press, 1992.

Los anticuerpos policlonales o monoclonales pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, por unión a y elución desde una matriz en la cual está unido el polipéptido o un péptido contra el cual se crearon los anticuerpos. Los especialistas en la técnica conocerán diversas técnicas comunes en las técnicas de inmunología para la purificación y/o concentración de anticuerpos policlonales, así como anticuerpos monoclonales (véase por ejemplo, Coligan et al., unidad 9, *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991).

Para determinar que una preparación de anticuerpo dado (tal como uno producido en un ratón) se une específicamente al polipéptido diana o receptor de internalización de interés por transferencia de Western, se extraen las proteínas celulares totales que contienen el polipéptido diana o receptor de internalización de células de mieloma murinas y se someten a electroforesis en una gel de SDS-poliacrilamida. Las proteínas después se transfieren a una membrana (por ejemplo, nitrocelulosa), y la preparación de anticuerpo de ensayo se incuba con la membrana. Después de lavar la membrana para retirar los anticuerpos unidos de forma no específica, se detecta la presencia de anticuerpos unidos específicamente mediante el uso de un anticuerpo anti-ratón conjugado con una enzima tal como fosfatasa alcalina; la aplicación del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro azul de tetrazolio provoca la producción de un compuesto azul denso por fosfatasa alcalina inmuno-localizada. Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido diana o receptor de internalización de interés demostrarán, por esta técnica, unirse a la banda de polipéptido diana o receptor de internalización (que se localizará en una posición dada en el gel determinada por su peso molecular). Puede suceder unión no específica del anticuerpo a otras proteínas (tal como albúmina sérica) y puede ser detectable como una señal débil en la transferencia de Western. La naturaleza no específica de esta unión la reconocerá un especialista en la técnica mediante la señal débil y/o la parte no relacionada obtenida en la transferencia de Western en relación con la fuerte señal primaria que surge de la unión anticuerpo específico-polipéptido diana o receptor de internalización.

D. Producción de péptido

Los péptidos P4, péptidos del complemento, y péptidos derivados de patógenos se pueden preparar por técnicas de clonación. Ejemplos de técnicas apropiadas de clonación y secuenciación, e instrucciones suficientes para dirigir a los especialistas a través de muchos ejercicios de clonación se hallan en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Ed.), Vol. 1 - 3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Berger y Kimmel (eds.), *Guide to Molecular Cloning Techniques*, Academic Press, Inc., San Diego CA (1987), o Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley-Interscience, NY (1987). La información de los productos procedente de los fabricantes de reactivos biológicos y equipos experimentales también proporciona información útil. Dichos fabricantes incluyen la SIGMA Chemical company (Saint Louis, MO), R&D Systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH® Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc.

(Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), INVITROGEN™ (San Diego, CA), y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como muchas otras fuentes comerciales conocidas para los especialistas. En algunos ejemplos, se purifican péptidos, tales como péptidos del complemento de un sujeto, por ejemplo de una fracción de sangre de un sujeto, tal como suero obtenido de un sujeto.

5 En algunas realizaciones, los péptidos se producen de forma recombinante, por ejemplo a partir de células transformadas o transfectadas con polinucleótidos que codifican los péptidos o parte de los mismos. Los métodos para la manipulación e inserción de los ácidos nucleicos que codifican los péptidos de esta descripción o partes de los mismos en vectores para la expresión de polipéptidos son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 1994).

15 Las construcciones de ácido nucleico que codifican los péptidos o partes de los mismos de esta descripción pueden insertarse en plásmidos. Sin embargo, pueden utilizarse otros vectores (por ejemplo, vectores virales, fagos, cósmidos, etc.) para replicar los ácidos nucleicos. En el contexto de esta descripción, las construcciones de ácido nucleico normalmente son vectores de expresión que contienen una secuencia promotora que facilita la transcripción eficaz de la secuencia genética insertada del hospedador. El vector de expresión normalmente contiene un origen de replicación, un promotor, así como secuencias de ácido nucleico específicas que permiten la selección fenotípica de las células transformadas.

25 Más generalmente, las secuencias polinucleotídicas que codifican péptidos o partes de los mismos de esta descripción pueden unirse de forma funcional a cualquiera promotor y/o potenciador que sea capaz de dirigir la expresión de ácido nucleica después de su introducción en una célula hospedadora. Un promotor es una serie de secuencias de control de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Se incluyen tanto promotores constitutivos como inducibles (véase, por ejemplo, Bitter et al., *Methods in Enzymology* 153:516 - 544, 1987).

30 Las secuencias de ADN que codifican péptidos o partes de los mismos pueden expresarse *in vitro* por transferencia de ADN a una célula hospedadora adecuada. La célula puede ser procariota o eucariota. Los hospedadores pueden incluir organismos microbianos, de levadura, de insecto, y de mamífero. El término también incluye cualquier descendencia de la célula hospedadora objeto. Los métodos de transferencia estable, que significa que el ADN foráneo se mantiene continuamente en el hospedador, son conocidos en la técnica.

35 La transformación de una célula hospedadora con ADN recombinante puede realizarse por técnicas convencionales que son bien conocidas para los especialistas en la técnica. Cuando la hospedador es procariota, tal como *E. coli*, puede prepararse células competentes que son capaces de captar ADN a partir de células recogidas tras la fase de crecimiento exponencial y posteriormente tratadas por el método de CaCl₂ usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, se puede usar MgCl₂ o RbCl. La transformación también puede realizarse después de formar un protoplasto de la célula hospedadora si se desea, o por electroporación.

45 Cuando el hospedador es un eucariota, pueden usarse métodos de transfección de ADN tales como coprecipitación con fosfato de calcio, procedimientos mecánicos convencionales tales como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido revestido en liposomas, o vectores virales. Las células eucariotas también pueden co-transformarse con secuencias polinucleotídicas que codifican péptidos o partes de los mismos, y una segunda molécula de ADN foráneo que codifica un fenotipo de selección, tal como el gen de timidina quinasa del herpes simple. Otro método es usar un vector viral eucariota, tal como el virus de simio 40 (SV40) o el virus del papiloma bovino, para infectar o transformar de forma transitoria células eucariotas y expresar la proteína (véase por ejemplo, *Eukaryotic Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982). Los péptidos pueden purificarse después para las células hospedadoras usando métodos conocidos en la técnica.

55 Los péptidos inmunogénicos derivados de patógenos y/o péptidos P4 también pueden producirse, por ejemplo por síntesis química mediante cualquiera de varios métodos manuales o automatizados de síntesis conocidos en la técnica. Por ejemplo, se realiza síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) a una escala de 0,25 milimoles (mmol) usando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems modelo 431A y usando protección amino-terminal con 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), acoplamiento con dicitclohexilcarbodiimida/hidroxibenzotriazol o hexafluorofosfato de 2-(1H-benzo-triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio/hidroxibenzotriazol (HBTU/HOBT), y usando p-hidroximetilfenoximetilpoliestireno (HMP) o resina Sasrin para ácidos carboxilo-terminales o resina de amida Rink para amidas de carboxilo-terminales.

60 Los aminoácidos Fmoc-derivatizados se preparan a partir de aminoácidos precursores apropiados por tritilación y trifenilmetanol en ácido trifluoroacético, seguido por derivatización Fmoc como se describe por Atherton et al. *Solid Phase Peptide Synthesis*, IRL Press: Oxford, 1989.

65 Los péptidos unidos a resina Sasrin se escinden usando una solución de TFA al 1 % en diclorometano para producir el péptido protegido. Cuando resulta apropiado, se ciclan los precursores peptídicos protegidos entre los extremos

amino- y carboxilo-terminales por reacción de la amina libre amino-terminal y el ácido libre carboxilo-terminal usando difenilfosforilazida en péptidos nacientes donde se protegen las cadenas laterales de los aminoácidos.

5 Los productos unidos a resina HMP o de amida Rink se escinden de forma rutinaria y se desprotegen los péptidos ciclados que contienen cadenas laterales protegidas usando una solución compuesta por ácido trifluoroacético (TFA), que opcionalmente también comprende agua, tianisol, y etanodiol, en proporciones de 100:5:5:2,5, durante 0,5 - 3 horas a temperatura ambiente.

10 Los péptidos en bruto se purifican por cromatografía líquida de alta presión preparativa (HPLC), por ejemplo usando una columna Waters Delta-Pak C18 y elución en gradiente con TFA al 0,1 % en agua modificada con acetonitrilo. Después de la elución de la columna, se evapora el acetonitrilo de las fracciones eluidas, que después se liofilizan. La identidad de cada producto producido y purificado de este modo se puede confirmar por espectroscopia de masas por bombardeo de átomos rápidos (FABMS) o espectroscopia de masas por electronebulización (ESMS).

15 Los péptidos producidos por dichos métodos se pueden usar para producir anticuerpos opsonicos para los patógenos de los cuales se obtienen los péptidos inmunogénicos. Los métodos para determinar la capacidad opsonica de un anticuerpo pueden determinarse por métodos, conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo los métodos descritos en la solicitud de patente internacional N° PCT/US2006/015499 y la solicitud de patente de Estados Unidos N° 11/910.517.

20 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar características particulares de ciertas realizaciones.

Ejemplos

25 Ejemplo 1

Este ejemplo describe ensayos que demuestran la potenciación de la opsonofagocitosis por el péptido P4.

30 **Materiales y métodos**

Síntesis de péptido. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos denominados P4, P6, y P7 se han descrito previamente (véase por ejemplo Rajam et al., *Microb Pathog* 2008; 44:186 -96; Romero-Steiner et al., *Vaccine* 2006; 24:3224 - 31). Se sintetizaron péptidos puros con un extremo N y C libre y se liofilizaron a el Centers for Disease Control (CDC) y la Emory University Microchemical Facility. Los péptidos usados en este Ejemplo se sintetizaron en un sintetizador de múltiples péptidos Advanced ChemTech 396 mediante protocolos convencionales y modificados de 9-fluorenilmetoxicarbonilo. El péptido liofilizado se resuspendió en agua con dietilpircarbonato (DEPC), se sonicó durante 3 minutos para su disolución, y se almacenó a -70 °C. Se obtuvieron dos péptidos, P6 y/o P7, de la secuencia P4. Estos péptidos no tuvieron efecto de activación sobre las células eucariotas ensayadas (véase Rajam et al., *Microb Pathog* 44:186 -96, 2008). Estos péptidos se usaron como controles negativos en todos los ensayos *in vitro* descritos en este Ejemplo.

Anticuerpos específicos de especie usados en este Ejemplo. Se ha usado globulina (Gamunex®) como fuente de anticuerpos contra polisacárido (Ps) específico de serotipo de neumococo (véase por ejemplo Rajam et al., *Clin Vaccine Immunol*, 14:1223 - 7, 2007; Romero-Steiner et al., *Clin Diagn Lab Immunol* 10:1019 -24, 2003). QC2, QC5, y QC268 son sueros humanos de control de calidad propios CDC con títulos asignados a organismos diana (véase por ejemplo Martinez et al., *Clin Diagn Lab Immunol* 9:485- 8, 2002; Martinez et al., *Clin Vaccine Immunol* 13:459 - 66, 2006). También se usó un anticuerpo monoclonal con especificidad por adhesina A de superficie de neumococos descrito por Srivastava et al. (*Hybridoma* 2000; 19:23 - 31), 8G12G11B10 (8G12), como fuente de anticuerpo anti-proteína de estreptococos. Estos sueros se seleccionaron para asegurar la presencia de anticuerpos específicos y demostrar la especificidad de la potenciación inmune mediada por P4. El diseño del ensayo *in vitro* implicó la comparación directa de cambios en la eliminación opsonofagocítica (OPK) o la captación en presencia o ausencia de P4.

Ensayo OPK. En este Ejemplo, se usó el ensayo OPK de referencia, descrito en Romero-Steiner y col., *Clin Diagn Lab Immunol*, 4:415 - 22, 1997, con células de leucemia promielocítica humana (HL-60) diferenciadas en granulocitos. Se usó gamma globulina como fuente de anticuerpos específicos de serotipo para *S. pneumoniae* serotipo 3 (WU2), se propagó, se almacenó, y se usó en este ensayo como se describe por Romero-Steiner et al., *Clin Vaccine Immunol*, 13:165 - 9, 2006 y Rajam et al., *Clin Vaccine Immunol*, 14:1223 - 7, 2007. Se añadió solución de péptido P4 (100 µg/ml) a la mezcla de ensayo OPK en la fase de preopsonización, y los pocillos de control recibieron 10 µl de agua DEPC en su lugar. También se evaluó la potenciación mediada por P4 de OPK con *S. pneumoniae* serotipos 6B, 15B, 15C, y 19A, usando gamma globulina u 8G12.

Ensayo de captación opsonofagocítica por citometría de flujo. El ensayo opsonofagocítico por citometría de flujo (fOPA) se realizó con células HL-60 diferenciadas en granulocitos o monocitos como se describe por Martinez et al., *Clin Diagn Lab Immunol* 9:485- 8, 2002; Martinez et al., *Clin Vaccine Immunol* 13:459 - 66, 2006; y Mezzatesta et al., *Infect Immun* 42:99 -105, 1983. Se usaron sueros de control de calidad propios (QC5 y QC268) como fuente para

anticuerpos específicos de serotipo contra el Ps capsular de *S. pneumoniae* serotipo 14 y *Neisseria meningitidis* A, respectivamente. Se unieron perlas de poliestireno covalentemente a antígenos de *S. pneumoniae* y no de *S. pneumoniae*, como se describe por Martínez et al., Clin Diagn Lab Immunol 9:485- 8, 2002; y Martínez et al., Clin Vaccine Immunol 13:459 - 66, 2006 y se usaron en fOPA. Se añadió solución de péptido P4 (100 µg/ml) a la mezcla fOPA en la fase de preopsonización, y los pocillos de control recibieron 10 µl de agua DEPC en su lugar.

Marcaje con OXYBURST® de aislado de *S. pneumoniae*. Para demostrar la potenciación del estallido respiratorio intracelular en las células efectoras en respuesta a activación mediada por P4, se usó un aislado de *S. pneumoniae* marcado con OXYBURST®. Se cultivó una carga completa de la solución madre congelada de *S. pneumoniae* serotipo 23F durante una noche (37 °C en CO₂ al 5 %) en caldo Todd-Hewitt (Difco) suplementado con extracto de levadura al 0,5 % (THYE). Se transfirió una carga completa del cultivo durante una noche a 1 ml de caldo THYE fresco y se incubó durante 3 horas. A partir de esto, se transfirieron 200 µl a 5 ml de caldo THYE y se incubaron durante 3 horas, después de los cual se transfirió 1 ml a 5 ml de caldo THYE y se incubaron durante otras 3 horas (todas las incubaciones se hicieron a 37 °C en CO₂ al 5 %). Después del tercer pase, la suspensión bacteriana se centrifugó a 6000 g durante 10 minutos y se resuspendió en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 0,01 mol/l. El colorante OXYBURST® (INVITROGEN®) se reconstituyó con 1 ml de agua desionizada, y se añadieron 50 µl a la suspensión bacteriana de 1 ml. Esto se dejó mezclar minuciosamente en un agitador rotario durante una noche a 4 °C. Después de ello, la suspensión bacteriana marcada con OXYBURST® se lavó dos veces en PBS y se usó como fuente de antígeno en lugar de perlas de poliestireno en fOPA. Se usó suero de control de calidad propio (QC2) en este ensayo.

Aislamiento de leucocitos polimorfonucleares de sangre humana

Se obtuvo sangre venosa heparinizada del Emory Blood Donor Services. Se usó un kit de separación de leucocitos, HISTOPAQUE®-1119 (Sigma), para separar granulocitos de la sangre, de acuerdo con el método recomendado por el fabricante.

Cepas de ratón. Se obtuvieron ratones (*Mus musculus*) de la cepa Swiss Webster (ND4-SW) de Charles River Laboratories. Los ratones usados en este estudio eran de 6 - 10 semanas de edad. Todos experimentos se aprobaron por el comité institucional y se realizaron de acuerdo con las directrices éticas institucionales para experimentos en animales y directrices de seguridad.

Cepas bacterianas. Se usó *S. pneumoniae* WU2 (serotipo 3) para infecciones de ratón. Este aislado de *S. pneumoniae* se seleccionó del Streptococcal Reference Laboratory, CDC. En resumen, se sembró en estrías el aislado de *S. pneumoniae* (solución madre congelada) en una placa de agar de sangre (base de agar de sangre más sangre de oveja al 5 %) y se incubó (a 37 °C en CO₂ al 5 %) durante 18 - 24 horas. Se rasparon las colonias de *S. pneumoniae* en las placas de agar de sangre con un bucle de inoculación y se cultivaron en 5 ml de caldo THYE durante ~4 horas (a 37 °C en CO₂ al 5 %) hasta fase semilog (lectura de densidad óptica a 492 nm, 0,5 - 0,6). Este cultivo (1,5 ml) se centrifugó en un tubo de tapón a rosca de polipropileno de 2 ml a 10.000 g durante 5 minutos, y el sedimento húmedo se resuspendió en 1 ml de PBS a 0,1 mol/l (pH 7,2). La suspensión bacteriana de 1 ml se colocó en hielo y se usó para infecciones. También se diluyó 10⁻⁶ con PBS, y se contó la carga bacteriana viable en las placas de agar de sangre. La carga bacteriana viable promedio fue de 4 x 10⁷ células/ml.

Infección intranasal. Se infectaron los ratones por vía intranasal con *S. pneumoniae* mediante métodos descritos por Briles et al., J Infect Dis 188:339 - 48, 2003. En resumen, se inyectó a un ratón por intraperitoneal 20 µl de KETASET® (100 mg/ml de clorhidrato de ketamina; Wyeth). Una vez el ratón estuvo letárgico, se distribuyeron 40 µl de la suspensión bacteriana preparada previamente gota por gota cerca de la nariz, permitiendo que el ratón inhalara la infección.

Terapia intraperitoneal (ip) e intravenosa (iv). La infección con 4 x 10⁷ células de *S. pneumoniae* WU2 por ratón provocó en características moribundas a las 48 horas en el 50 %-60 % de los animales. A las 72 horas, todos los ratones infectados estaban moribundos (n = 60; valor moribundo, 2 - 3 [véase a continuación]). A las 72 y 96 horas después de la infección, se inmunizó a 40 animales de forma pasiva con gamma globulina (100 µl/ratón; iv, n = 20; ip, n = 20). Después de un lapso de tiempo de 20 minutos, que permite la posible preopsonización *in vivo*, 20 de los ratones inmunizados de forma pasiva (intravenoso (iv), n = 10; intraperitoneal (ip), n = 10) recibieron P4 (100 µg; 100 µl/ratón) a través de vía iv o ip. A los ratones de control se les dio agua DEPC (100 µl) o P4 en solitario. Inicialmente, se ensayó el péptido P4 para toxicidad en ratones a 1, 10, 100, y 1000 µg. P4 se inyectó ip en ratones ND4-SW de 10 semanas de edad a un volumen constante de 100 µl. P4 no tuvo efecto tóxico aparente en los ratones, incluso a dosis de 1000 µg/ratón.

Valoración de las características moribundas. Se controló a los ratones y se les valoró visualmente dos veces al día para las características moribundas. Ratones se clasificaron en una escala de 5 a 0, en que 5 indicaba saludable con pelaje, piel, ojos, respiración, y actividad/movimiento normales; 4, saludable pero comenzando a parecer enfermo, pelaje erizado; 3, enfermo, pelaje erizado, actividad disminuida; 2, muy enfermo, pelaje erizado, actividad disminuida, secreciones oculares; 1, al borde de la muerte, pelaje erizado, poca o ninguna actividad, secreciones

oculares, respiración disminuida (estos animales, por lo tanto, se sacrificaron); y 0, muerte.

Análisis de citoquinas. Se sacrificaron y decapitaron los ratones tratados con P4 y de control. La sangre se recogió rápidamente en crioviales desde la base del cuello y se dejó reposar a 4 °C durante 30 minutos. El tubo después se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos. Se recogieron muestras de suero y se usaron inmediatamente para el análisis de citoquinas. Se analizaron las citoquinas en suero de ratón mediante el kit de citoquinas 22-plex de ratón LINCOPLEX™ basado en LUMINEX® (MCYTO-70K-PMX22; LINCO Research), usando el protocolo de recomendado por el fabricante.

Estadística. Todos los experimentos *in vitro* se realizaron por triplicado en 3 días de ensayo diferentes, salvo que se especifique de otro modo. Los experimentos de exposición *in vivo* se repitieron >5 veces. La cantidad de animales moribundos después del tratamiento se registró durante 166 horas, y los datos se analizaron para diferencias significativas entre los diversos grupos mediante el uso de un ensayo *t* con muestras relacionadas para la media (Microsoft® Excel 2003).

RESULTADOS

Ensayo OPK. El péptido P4 se ensayo para su potencial de potenciar la opsonofagocitosis *in vitro*, y los datos se dan en la FIG. 1. Los datos presentados en la FIG. 1A muestran que el aumento mediado por P4 en OPK de *S. pneumoniae* serotipo 3 (WU2) era dependiente de la concentración de anticuerpo. Aunque se observa un aumento del 35 % en OPK a una dilución 1:8 de gamma globulina, el efecto se valora con la dilución del antisuero (FIG. 1A). El aumento mediado por P4 en OPK era dependiente del complemento, porque no se observó aumento en OPK con P4 sobre el control en ausencia de un fuente de complemento (FIG. 1B). La potenciación mediada por P4 de OPK era dependiente de la concentración de P4 en la mezcla de reacción. Aunque no se observaron cambios en OPK con suplementación con P4 a 5 µg/ml, se observó un aumento gradual con un aumento en la concentración de P4 (para 10 µg/ml, 8 %; para 50 µg/ml, 30 %; para 100 µg/ml, 35 %). A una concentración de 100 µg/ml, el aumento mediado por P4 en OPK se estabilizaba (FIG. 1C). Se registró también un aumento mediado por P4 similar en OPK con *S. pneumoniae* serotipos 6B, 15B, 15C, y 19A, usando gamma globulina u 8G12 como fuente de anticuerpos específicos.

Ensayo de captación opsonofagocítica (OPU). Se ensayó la potenciación mediada por P4 de la opsonofagocitosis para cambios en el estallido respiratorio intrafagocítico mediante *S. pneumoniae* serotipo 23F marcado con OXYBURST® (DS3848 - 03). El aumento mediado por P4 en OPU se caracterizaba por un aumento en el estallido respiratorio intrafagocítico que se valoró con la dilución de anticuerpo (FIG. 2A). Los datos presentados en la FIG. 2B y 2C muestran a P4 como pluripotente en la activación de diferentes células efectoras y la potenciación de OPU en presencia de anticuerpos de específicos de antígeno y complemento. Hubo un aumento de ≥50 % en OPU de perlas de Ps de *S. pneumoniae* serotipo 14 por los granulocitos aislados de sangre humana fresca, que se valoró con la dilución de anticuerpo (para 1:64, 52 %; para 1:128, 48 %; para 1:256, 25 %; para 1:512, 5 %) (FIG. 2B). La FIG. 2C muestra que P4 puede potenciar la opsonofagocitosis *in vitro* de antígenos no de *S. pneumoniae* en presencia de anticuerpos específicos y células efectoras. Se registró un aumento mediado por P4 en la OPU de perlas recubiertas con Ps de *N. meningitidis* A, con células HL-60s diferenciadas en monocitos (FIG. 2C).

Estudios *in vivo*. Se inmunizaron de forma pasiva ratones infectados con *S. pneumoniae* WU2 con gamma globulina y/o P4 a las 72 y 96 horas después de la infección. Aunque los ratones no tratados tenían una supervivencia del 10 % (1 en 10), los ratones tratados con gamma globulina solamente (tanto *iv* como *ip*) tenían una supervivencia del 30 %. Por otro lado, 8 (80 %) de 10 ratones ($P < 0,001$) tratados con gamma globulina y P4 *iv* y 6 (60 %) de 10 ratones ($P < 0,001$) tratados con gamma globulina y P4 *ip* mostraron remisión completa de bacteremia y agonía (FIG. 3). El análisis de citoquinas de muestras séricas de ratón no mostró patrones consistentes o cambios en los niveles de citoquinas en los animales rescatados.

Ejemplo 2

Esto ejemplo describe la evaluación de la co-administración de péptido P4 y antibióticos como nuevo enfoque terapéutico para tratar infección grave por neumococos.

Materiales y métodos

Bacteria, péptido, anticuerpos, y antibiótico usados en este Ejemplo. Se usó *S. pneumoniae* serotipo 3 (WU2) para las infecciones de ratón como se ha descrito previamente (Rajam et al. *J. Infect. Dis.* 199:1233 - 1238, 1999). P4, un péptido de 28 aminoácidos, se sintetizó, purificó, y preparó para terapia de combinación como se ha descrito previamente (Carlone et al. *Microb. Pathog.* 44:186 - 196, 2008). Se usó gamma globulina (inmunoglobulina intravenosa [IVIG]; Gamunex, Telecris, NC) como fuente de anticuerpos contra polisacárido específico de serotipo de Pnc (Frasch y Scott *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11:1158 - 1164, 2004; Rajam et al., *Clin. Vaccine Immunol.* 14:1223 - 1227, 2007; Romero-Steiner et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:1019 - 1024, 2003). Se disolvió ceftriaxona (n° catálogo C5793; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), una cefalosporina de amplio espectro, en solución salina tamponada con fosfato (0,01 M), y se prepararon diluciones de trabajo en solución salina tamponada con fosfato para inoculaciones en ratón.

Ratones usados en este ejemplo. Se usaron ratones Swiss Webster hembra (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) de 6 a 10 semanas de edad en este estudio. Todos los experimentos se aprobaron por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) y se realizaron de acuerdo con las directrices éticas institucionales para experimentos en animales y las directrices de seguridad.

Infección intranasal. Las infecciones intranasales de ratones con un aislado de Pnc se realizaron adoptando la metodología descrita por Briles *et al.*, 2003. En resumen, se inyectó a un ratón por vía intraperitoneal (ip) 20 µl de clorhidrato de ketamina a 100 mg/ml (KETASET®; Wyeth). Una vez el ratón estuvo letárgico, se distribuyeron 40 µl de la suspensión bacteriana (~2,1 x 10⁷ células/ratón) gota por gota cerca de la nariz, permitiendo que el ratón inhalara las bacterias. Desaliño combinado con una postura encorvada o letargia indicaba agonía en un ratón. La mayoría de los ratones (80 %) estaban moribundos a las 48 horas tras la exposición. Los ratones moribundos se dividieron en diversos grupos de control y tratamiento (*n* = 10/grupo) como se muestra en la Tabla 1. Los grupos de control incluían animales no tratados o animales que recibieron P4 solamente, IVIG solamente, o ceftriaxona (a 0,3, 3,0, 300, o 3.000 µg/ratón) solamente. Los grupos de tratamiento incluían ratones que recibieron un único inóculo que contenía P4 e IVIG con o sin ceftriaxona a una de tres diferentes dosis (0,3, 3,0, o 300 µg/ratón).

Terapia de combinación. Los ratones se contuvieron usando un inmovilizador Tailveiner (modelo nº TV-150; Braintree Scientific, Braintree, MA). Se administró IVIG y/o P4 por vía intravenosa (iv) usando una aguja de calibre 25 y una jeringa de 1 ml. IVIG (100 µl de volumen/ratón) se administró primero, seguido 20 min más tarde por P4 (50 µg en 100 µl de volumen/ratón). La ceftriaxona se administró (ip en 100 µl de volumen/ratón) 30 min después de la administración de P4. Los animales se controlaron a diario durante 7 días o (en el estudio de infección repetido) 36 días después del tratamiento para los signos clínicos de progresión de la enfermedad. Para terapia repetida, los ratones rescatados con terapia de combinación con P4 se volvieron a infectar en el día 28 post tratamiento y se trataron de nuevo con terapia de combinación con P4. A pesar de que del 25 al 30 % de los ratones en el grupo de control sobrevivieron a la primera exposición, posteriormente sucumbieron a la infección o quedaron enfermos de forma terminal y por tanto se sacrificaron humanamente. Por lo tanto, no hubo ratones de control de la primera exposición para la terapia repetida.

Ensayo para bacteremia. Se recogieron muestras de sangre de ratones tratados con P4 y no tratados (Rajam *et al.*, J. Infect. Dis. 199:1233 - 1238, 2009), y se extendieron alícuotas de 100 µl de las muestras de sangre heparinizadas en placas de agar de sangre (base de agar de sangre más sangre de oveja al 5 % más gentamicina [2,5 mg/litro]). Las placas se incubaron durante 18 a 24 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %, y se contaron las bacterias.

Opsonofagocitosis potenciada por P4. Se usó el ensayo de eliminación opsonofagocítica *in vitro* (OPKA) descrito previamente por Romero-Steiner *et al.* (Romero-Steiner *et al.*, Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4:415 - 422, 1997) con leucocitos polimorfonucleares (PMN) aislados de ratones (Devi *et al.*, Indian J. Physiol. Pharmacol. 39:354 - 360, 1995). Se recogieron muestras de sangre periférica de ratones 1 y 2 horas tras la infección (con Pnc WU2) o de controles no infectados como se ha descrito previamente (Frasch y Scott, 2004), y se separaron las fracciones de capa leuco-plaquetaria (Devi *et al.*, 1995) y se usaron como fuente de células efectoras. Se usó gamma globulina (Gamunex, Telecris, NC) como fuente de anticuerpo específico de serotipo. *S. Pneumoniae* serotipo 3 (WU2) se propagó, se almacenó, y se usó en este ensayo como se ha descrito previamente (Rajam *et al.*, 2007; Romero-Steiner, 2006). Se añadió una solución de péptido P4 a 100 µg/ml a la mezcla OPKA en la fase de preopsonización, y los pocillos de control recibieron agua con dietil pirocarbonato.

ELISA para IgG anti-P4. Se recogieron muestras de sangre de ratones tratados con terapia con P4 14 días después de la infección, y las fracciones de suero se separaron adoptando la metodología descrita previamente (Rajam, 2009). Se realizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para detectar y cuantificar la inmunoglobulina G (IgG) antiproteína como se ha descrito previamente, con modificaciones minoritarias (Scott, *et al.*, Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12:1195 - 1201, 2005; Scott *et al.*, J. Infect. Dis. 186:220 - 226, 2002). En resumen, se recubrieron placas ELISA con el péptido P4 a una concentración de 5 µg/ml. Las placas se incubaron a 4 °C durante una noche y se usaron para detectar y cuantificar la IgG anti-P4 en sueros de ratón. Se usó anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano rusticano (Sigma, St. Louis, MO) como anticuerpo indicador. Se usó SUREBLUE® 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (KPL, Gaithersburg, MD) como sustrato, y se usó HCl 1 N como solución de detención. Las muestras se ensayaron por triplicado, y se incluyeron controles positivos y negativos adecuados.

Estadística. Los experimentos de terapia de combinación *in vivo* se repitieron de tres a cinco veces, y la terapia de repetición se realizó una vez. Se registraron las cantidades de animales moribundos hasta 7 y 36 días después de las terapias de combinación y repetición, respectivamente, y los datos se analizaron para diferencias significativas entre los diversos grupos usando el ensayo t de dos muestras relacionadas para la media MICROSOFT® Excel 2003.

RESULTADOS

Terapia de combinación. Los ratones de control no tratados (*n* = 10) tuvieron una tasa de supervivencia del 30 % a

las 168 horas. Los ratones tratados con ceftriaxona solamente a 3.000 µg tuvieron una tasa de supervivencia del 90 % (FIG. 4). Por otro lado, ceftriaxona a dosis bajas (300, 3,0, y 0,3 µg) o P4 solamente ofrecieron poca protección, con tasas de supervivencia comparables a las de controles no tratados. El tratamiento ratones moribundos con una concentración de P4 de 50 µg con IVIG administrado en una única dosis condujo a una tasa de supervivencia del 70 % (FIG. 4). La combinación de una dosis baja (300 µg) de ceftriaxona con esta mezcla terapéutica IVIG-P4 aumentó la tasa de supervivencia del ratón al 100 %, significativamente mejor que la de controles no tratados ($P < 0,05$) (FIG. 4).

Terapia de repetición. Los ratones ($n = 10$) rescatados de infección fatal por *S. pneumoniae* WU2 con terapia de combinación (P4, IVIG, y ceftriaxona) se volvieron a infectar con *S. pneumoniae* WU2 después de 28 días y se volvieron a tratar con la terapia de combinación cuando parecieron estar moribundos. La terapia de combinación mediada por P4 rescató a todos los animales infectados (FIG. 5).

Ensayo para bacteremia. Se extrajeron muestras de sangre de ratones tratados con P4 y no tratados y se ensayaron para bacteremia. Las muestras de sangre de los ratones de control no tratados contenían cargas de bacterias demasiado numerosas para contarlas. Las muestras de animales tratados no tenían bacteremia.

Opsonofagocitosis potenciada por P4. Se realizó un OPKA con PMN de ratones infectados o no infectados. La adición de P4 aumentó significativamente (en $>80\%$; $P < 0,05$) la eliminación opsonofagocítica in vitro de Pnc (WU2) sobre el nivel de control en presencia de IgG específica de serotipo (FIG. 6).

ELISA para IgG anti-P4. Se ensayaron muestras de sangre de ratones tratados con P4 para anti-P4 usando un ELISA específico de IgG de ratón. Todas las muestras fueron negativas para IgG anti-P4.

TABLA 1. Diseño del estudio

Tratamiento	Grupo ^a	Uso ^b de:					
		P4	Gamma globulina	Ceftriaxona			
				3.000 µg	300 µg	3,0 µg	0,3 µg
Terapia de combinación	1	-	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	+	-	-	-
	5	-	-	-	+	-	-
	6	-	-	-	-	+	-
	7	-	-	-	-	-	-
	8	+	+	-	-	-	-
	9	+	-	-	+	-	-
	10	+	+	-	-	+	-
	11	+	+	-	-	-	+
Terapia repetida	10	+	+	-	-	+	-

^an = 10/grupo. Todos los grupos recibieron *S. pneumoniae* serotipo 3 (WU2) por vía intranasal a $\sim 2,1 \times 10^7$ células/40 µl/ratón.

^b P4 a 50 µg en un volumen de 100 µl y se administraron 100 µl de gamma globulina iv; la ceftriaxona se administró ip a las dosis indicadas en un volumen de 100 µl. +, incluido en la mezcla terapéutica; -, no incluido en la mezcla terapéutica.

Ejemplo 3

Tratamiento de sujetos con péptido P4

Este ejemplo describe métodos que pueden usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una infección por un patógeno de interés (tal como los patógenos enumerados en el sumario de términos) que puede tratarse por opsonofagocitosis del patógeno de interés por administración de uno o más péptidos P4, y opcionalmente un anticuerpo opsónico y/o proteína del complemento. En algunos ejemplos, el uno o más péptidos P4 se administran sin un anticuerpo opsónico y/o proteína del complemento. En ejemplos particulares, el método incluye seleccionar un sujeto que tiene, se cree que tiene, o está en riesgo de tener (por ejemplo debido a inmunidad alterada, estado fisiológico, o exposición a un patógeno) una infección patogénica. Pueden examinarse sujetos de un estado de infección desconocido para determinar si tienen una infección, por ejemplo usando ensayos serológicos, examen físico, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), selección radiológica u otra técnica de diagnóstico conocida para los especialistas en la técnica. En algunos ejemplos, se selecciona un sujeto que tiene una infección patogénica o está en riesgo de adquirir una infección patogénica por un patógeno que no expresa adhesina A de superficie de neumococos (PsaA), por ejemplo el sujeto no tiene una infección por *Streptococcus pneumoniae*. Los sujetos encontrados que (o que se sabe que) tienen una infección patogénica y por lo tanto se puede tratar por administración de péptido P4 se seleccionan para recibir péptido P4. También pueden

seleccionarse sujetos que están en riesgo de desarrollar una infección patogénica por ejemplo, los ancianos, los inmunocomprometidos y los muy jóvenes, tales como bebés.

A los sujetos seleccionados para tratamiento se les puede administrar una cantidad terapéutica de péptido P4. El péptido P4 se puede administrar a dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por dosis, tal como 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal - 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dosis, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal - 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dosis, o 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal - 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dosis o incluso mayor. Sin embargo, la dosis particular puede determinarla un médico especialista. El agente puede administrarse en varios dosis, por ejemplo de forma continua, diaria, semanal, o mensual.

El modo de administración puede ser cualquiera usado en la técnica. La cantidad de agente administrada al sujeto puede determinarla un médico, y puede depender del sujeto particular tratado. Se proporcionan cantidades ejemplares específicas en este documento (pero la descripción no se limita a estas dosis).

15 Ejemplo 4

Tratamiento de sujetos con péptido P4 y anticuerpos opsónicos

Este ejemplo describe métodos que pueden usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una infección por un patógeno de interés (tal como los patógenos enumerados en el sumario de términos) que se puede tratar por opsonofagocitosis del patógeno de interés por administración de uno o más péptidos P4 y un anticuerpo opsónico que se une específicamente a un antígeno presente sobre la superficie del patógeno de interés. En ejemplos particulares, el método incluye seleccionar un sujeto que tiene, se cree que tiene o está en riesgo de tener una infección patogénica. Se pueden examinar sujetos de un estado de infección desconocido para determinar si tienen una infección, por ejemplo usando ensayos serológicos, examen físico, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), selección radiológica u otra técnica de diagnóstico conocida para los especialistas en la técnica. En algunos ejemplos, se seleccionan sujetos para identificar un patógeno particular de interés, con un ensayo serológico, o con una sonda de ácido nucleico específica para un patógeno de interés, o incluso un panel de sondas de ácido nucleico, tal como una serie, que puede identificar varios patógenos simultáneamente. Los sujetos encontrados que (o que se sabe que) tienen una infección patogénica por un patógeno de interés, por ejemplo *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitides* o *Staphylococcus aureus*, tal como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), y que por lo tanto se pueden tratar por administración de péptido P4 junto con un anticuerpo opsónico específico para el patógeno detectado de interés se seleccionan para administración de péptido P4 y el anticuerpo opsónico específico para el patógeno de interés. También se pueden seleccionar sujetos que están en riesgo de desarrollar una infección patogénica por ejemplo, sujetos expuestos a un patógeno conocido de interés, los ancianos, los inmunocomprometidos y los muy jóvenes, tales como bebés.

A los sujetos seleccionados para tratamiento se les puede administrar una cantidad terapéutica de péptido P4. El péptido P4 se puede administrar a dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por dosis, tal como 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal - 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dosis, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal - 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dosis, o 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal - 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dosis. A los sujetos se les administra una cantidad terapéutica de anticuerpo opsónico que es específico para el patógeno identificado de interés. El anticuerpo opsónico se puede administrar a dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por dosis, tal como 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal - 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dosis, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal - 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dosis, o 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal - 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dosis. Sin embargo, la dosis particular la puede determinar un médico especialista. El péptido P4 se puede administrar al mismo tiempo o secuencialmente con el anticuerpo opsónico. El péptido P4 y/o el anticuerpo opsónico se pueden administrar en una o varias dosis, por ejemplo de forma continua, diaria, semanal, o mensual. Cuando se administran secuencialmente, el tiempo que separa la administración del péptido P4 y el anticuerpo opsónico puede ser segundos, minutos, horas, días, o incluso semanas.

El modo de administración puede ser cualquiera usado en la técnica. La cantidad de agente administrada al sujeto puede determinarla un médico, y puede depender del sujeto particular tratado. Se proporcionan cantidades ejemplares específicas en este documento (pero la descripción no se limita a estas dosis).

55 Ejemplo 5

Tratamiento de sujetos con una combinación de antibióticos, péptido P4 y anticuerpos opsónico

Este ejemplo describe métodos que puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una infección por un patógeno de interés (tal como los patógenos enumerados en el sumario de términos) que se puede tratar por opsonofagocitosis del patógeno de interés por administración de uno o más péptidos P4 y un anticuerpo opsónico que se une específicamente a un antígeno presente sobre la superficie del patógeno de interés. En ejemplos particulares, el método incluye seleccionar un sujeto que tiene, se cree que tiene o está en riesgo de tener una infección patogénica. Se pueden examinar sujetos de un estado de infección desconocido para determinar si

tienen una infección, por ejemplo usando ensayos serológicos, examen físico, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), selección radiológica u otra técnica de diagnóstico conocida para los especialistas en la técnica. En algunos ejemplos, se seleccionan sujetos para identificar un patógeno particular de interés, con un ensayo serológico, o con una sonda de ácido nucleico específica para un patógeno de interés, o incluso un panel de sondas de ácido nucleico, tal como una serie, que puede identificar varios patógenos simultáneamente. Los sujetos encontrados que (o que se sabe que) tienen una infección patogénica por un patógeno de interés, por ejemplo *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitides* o *Staphylococcus aureus*, tal como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), y que por lo tanto se pueden tratar por administración de péptido P4 junto con antibióticos y un anticuerpo opsónico específico para el patógeno detectado de interés se seleccionan para administración de péptido P4, el antibiótico y el anticuerpo opsónico específico para el patógeno de interés. También se pueden seleccionar sujetos que están en riesgo de desarrollar una infección patogénica por ejemplo, sujetos expuestos a un patógeno conocido de interés, los ancianos, los inmunocomprometidos y los muy jóvenes, tales como bebés.

A los sujetos seleccionados para tratamiento se les administra una cantidad terapéutica de péptido P4. El péptido P4 se puede administrar a dosis de 1 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por dosis, tal como 1 µg/kg de peso corporal - 100 µg/kg de peso corporal por dosis, 100 µg/kg de peso corporal - 500 µg/kg de peso corporal por dosis, o 500 µg/kg de peso corporal - 1000 µg/kg de peso corporal por dosis. A los sujetos se les administra una cantidad terapéutica de anticuerpo opsónico que es específico para el patógeno identificado de interés. El anticuerpo opsónico se puede administrar a dosis de 1 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por dosis, tal como 1 µg/kg de peso corporal - 100 µg/kg de peso corporal por dosis, 100 µg/kg de peso corporal - 500 µg/kg de peso corporal por dosis, o 500 µg/kg de peso corporal - 1000 µg/kg de peso corporal por dosis. Sin embargo, la dosis particular la puede determinar un médico especialista. A los sujetos seleccionados para tratamiento se les administra una cantidad terapéutica de péptido P4. El antibiótico se puede administrar a dosis de 1 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por dosis (dependiendo de factores tales como la potencia y/o tipo de antibiótico), tal como 1 µg/kg de peso corporal - 100 µg/kg de peso corporal por dosis, 100 µg/kg de peso corporal - 500 µg/kg de peso corporal por dosis, o 500 µg/kg de peso corporal - 1000 µg/kg de peso corporal por dosis. El péptido P4 se puede administrar al mismo tiempo o secuencialmente con el antibiótico y el anticuerpo opsónico.

El modo de administración puede ser cualquiera usado en la técnica. La cantidad de agente administrada al sujeto puede determinarla un médico, y puede depender del sujeto particular tratado. Se proporcionan cantidades ejemplares específicas en este documento (pero la descripción no se limita a estas dosis).

Ejemplo 6

Tratamiento de sujetos con péptido P4 y antibiótico

Este ejemplo describe métodos que pueden usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una infección por un patógeno de interés (tal como los patógenos enumerados en el sumario de términos) que se puede tratar por opsonofagocitosis del patógeno de interés por administración de uno o más péptidos P4 y un anticuerpo opsónico que se une específicamente a un antígeno presente sobre la superficie del patógeno de interés. En ejemplos particulares, el método incluye seleccionar un sujeto que tiene, se cree que tiene o está en riesgo de tener una infección patogénica. Se pueden examinar sujetos de un estado de infección desconocido para determinar si tienen una infección, por ejemplo usando ensayos serológicos, examen físico, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), selección radiológica u otra técnica de diagnóstico conocida para los especialistas en la técnica. En algunos ejemplos, se seleccionan sujetos para identificar un patógeno particular de interés, con un ensayo serológico, o con una sonda de ácido nucleico específica para un patógeno de interés, o incluso un panel de sondas de ácido nucleico, tal como una serie, que puede identificar varios patógenos simultáneamente. Los sujetos encontrados que (o que se sabe que) tienen una infección patogénica por un patógeno de interés, por ejemplo *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitides* o *Staphylococcus aureus*, tal como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), y que por lo tanto se pueden tratar por administración de péptido P4 junto con un antibiótico específico para el patógeno detectado de interés se seleccionan para administración de péptido P4 y el antibiótico específico para el patógeno de interés. También se pueden seleccionar sujetos que están en riesgo de desarrollar una infección patogénica por ejemplo, sujetos expuestos a un patógeno conocido de interés, los ancianos, los inmunocomprometidos y los muy jóvenes, tales como bebés.

A los sujetos seleccionados para tratamiento se les administra una cantidad terapéutica de péptido P4. El péptido P4 se puede administrar a dosis de 1 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por dosis, tal como 1 µg/kg de peso corporal - 100 µg/kg de peso corporal por dosis, 100 µg/kg de peso corporal - 500 µg/kg de peso corporal por dosis, o 500 µg/kg de peso corporal - 1000 µg/kg de peso corporal por dosis. A los sujetos se les administra una cantidad terapéutica de anticuerpo opsónico que es específico para el patógeno identificado de interés. El antibiótico se puede administrar a dosis de 1 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por dosis, tal como 1 µg/kg de peso corporal - 100 µg/kg de peso corporal por dosis, 100 µg/kg de peso corporal - 500 µg/kg de peso corporal por dosis, o 500 µg/kg de peso corporal - 1000 µg/kg de peso corporal por

dosis. Sin embargo, la dosis particular la puede determinar un médico especialista. El péptido P4 se puede administrar al mismo tiempo o secuencialmente con el antibiótico. El péptido P4 y/o el antibiótico se pueden administrar en una o varias dosis, por ejemplo de forma continua, diaria, semanal, o mensual. Cuando se administran secuencialmente, el tiempo que separa la administración del péptido P4 y el antibiótico puede ser segundos, minutos, horas, días, o incluso semanas.

El modo de administración puede ser cualquiera usado en la técnica. La cantidad de agente administrada al sujeto puede determinarla un médico, y puede depender del sujeto particular tratado. Se proporcionan cantidades ejemplares específicas en este documento (pero la descripción no se limita a estas dosis).

Ejemplo 7

Tratamiento de sujetos en riesgo de neumonía con péptido P4

Este ejemplo describe métodos que pueden usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener neumonía, por ejemplo por un patógeno que se sabe que causa neumonía, tal como *Streptococcus pneumoniae*. En ejemplos particulares, el método incluye seleccionar un sujeto que tiene, se cree que tiene o está en riesgo de tener una infección patogénica que causa neumonía, tal como enfermedad por neumococos, por ejemplo infección con *Streptococcus pneumoniae*. Se pueden seleccionar sujetos que están en riesgo de desarrollar una infección patogénica por ejemplo, sujetos expuestos a un patógeno conocido de interés, los ancianos, los inmunocomprometidos (por ejemplo aquellos en terapias inmunosupresoras o infectados con VIH) y los muy jóvenes, tales como bebés. Un riesgo aumentado de infección por neumococos, tal como infección con *Streptococcus pneumoniae* se puede asociar con defectos en los mecanismos no específicos y específicos de defensa contra colonización, aspiración o invasión por *Streptococcus pneumoniae*. Ejemplos de dichos defectos incluyen reflejo disminuido de la tos, mala función ciliar, y deficiencias inmunes tales como hipogammaglobulinemia, defectos del complemento, leucopenia, o asplenia. Otros factores de riesgo incluyen demencia, trastornos de ataques, uso habitual de tabaco, tal como uso de cigarrillos, uso de alcohol, fallo congestivo del corazón, enfermedad cerebrovascular, institucionalización, y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). En sujetos con asplenia, por ejemplo, el riesgo de enfermedad por neumococos invasores es de aproximadamente 500 por 100.000 al año.

A los sujetos seleccionados para tratamiento se les puede administrar una cantidad terapéutica de péptido P4. El péptido P4 se puede administrar a dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por dosis, tal como 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal - 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dosis, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal - 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dosis, o 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal - 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dosis. En algunos ejemplos, a los sujetos también se les administra una cantidad terapéutica de anticuerpo opsónico que es específico para el patógeno identificado de interés. El anticuerpo opsónico se puede administrar a dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por dosis, tal como 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal - 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dosis, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal - 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dosis, o 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal - 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por dosis. Sin embargo, la dosis particular la puede determinar un médico especialista. El péptido P4 se puede administrar al mismo tiempo o secuencialmente con el anticuerpo opsónico. El péptido P4 y/o el anticuerpo opsónico se pueden administrar en una o varias dosis, por ejemplo de forma continua, diaria, semanal, o mensual. Cuando se administran secuencialmente, el tiempo que separa la administración del péptido P4 y el anticuerpo opsónico puede ser segundos, minutos, horas, días, o incluso semanas.

El modo de administración puede ser cualquiera usado en la técnica. La cantidad de agente administrada al sujeto puede determinarla un médico, y puede depender del sujeto particular tratado. Se proporcionan cantidades ejemplares específicas en este documento.

Debe entenderse que los elementos, características, compuestos, restos químicos, o ejemplos descritos junto con un aspecto particular, realización, o ejemplo de la invención son aplicables a cualquier otro aspecto, realización, o ejemplo de la invención.

Lista de secuencias

<110> EL GOBIERNO DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA REPRESENTADO POR EL SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS, CENTROS PARA EL CONTROL Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES

Ades, Edwin W.

Rajam, Gowrisankar

Steiner, Sandra

Carlone, George M.

Melnick, Nikkol

Sampson, Jacquelyn S.

Martinez, Joseph E.
Skinner, Julie M.

5 <120> MÉTODOS PARA POTENCIAR LA OPSONOFAGOCITOSIS EN RESPUESTA A UN PATÓGENO

<130> 6395 - 81059 - 02

<150> US 61/085.208

10 <151> 31-07-2008

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencia de péptido P4 sintético.

<400> 1

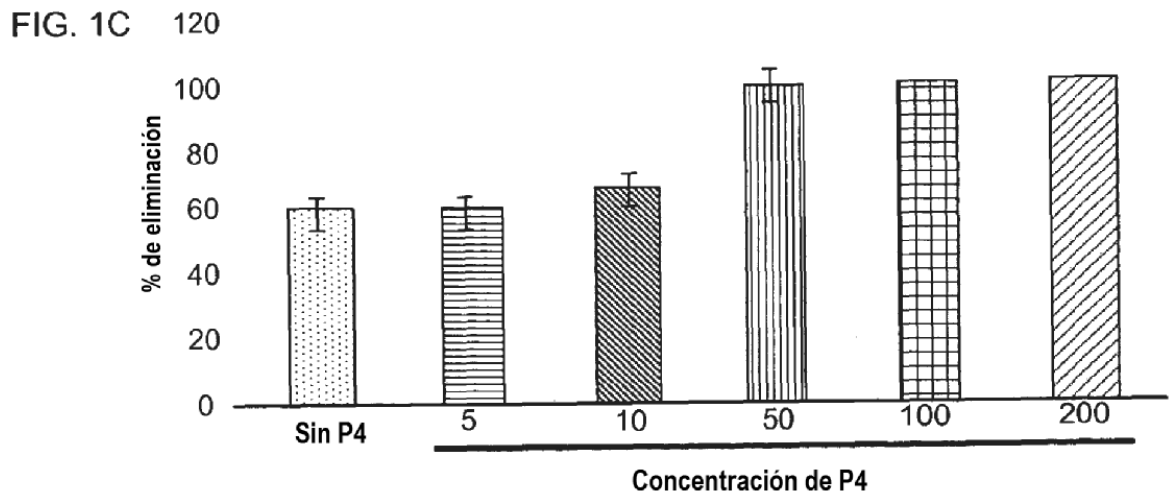
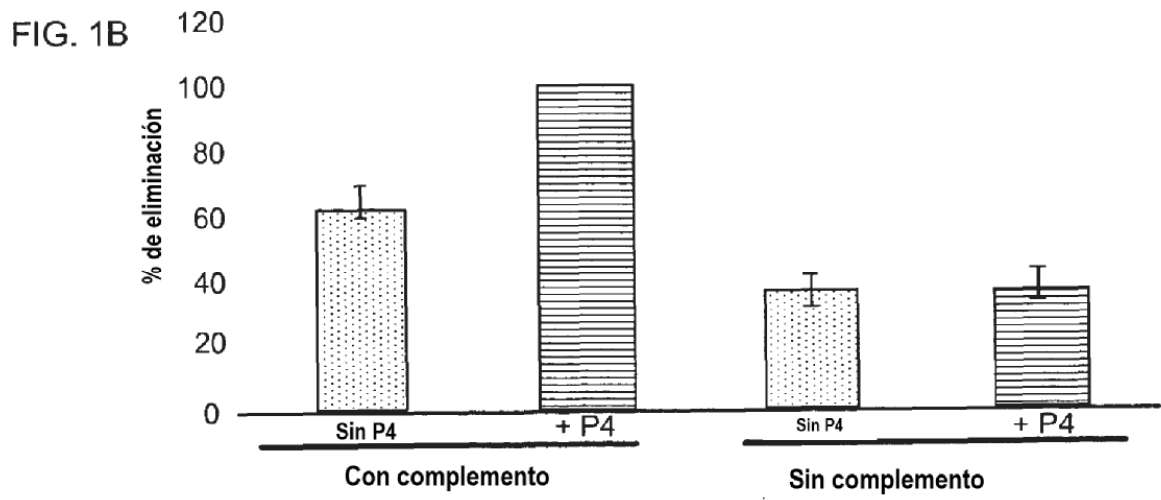
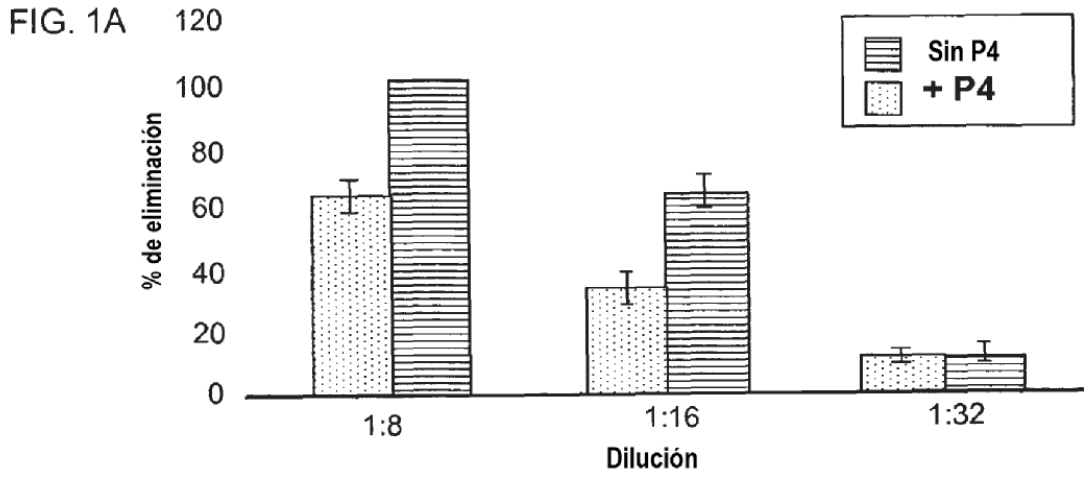
Leu Phe Val Glu Ser Ser Val Lys Arg Arg Pro Met Lys Thr Val Ser
1 5 10 15

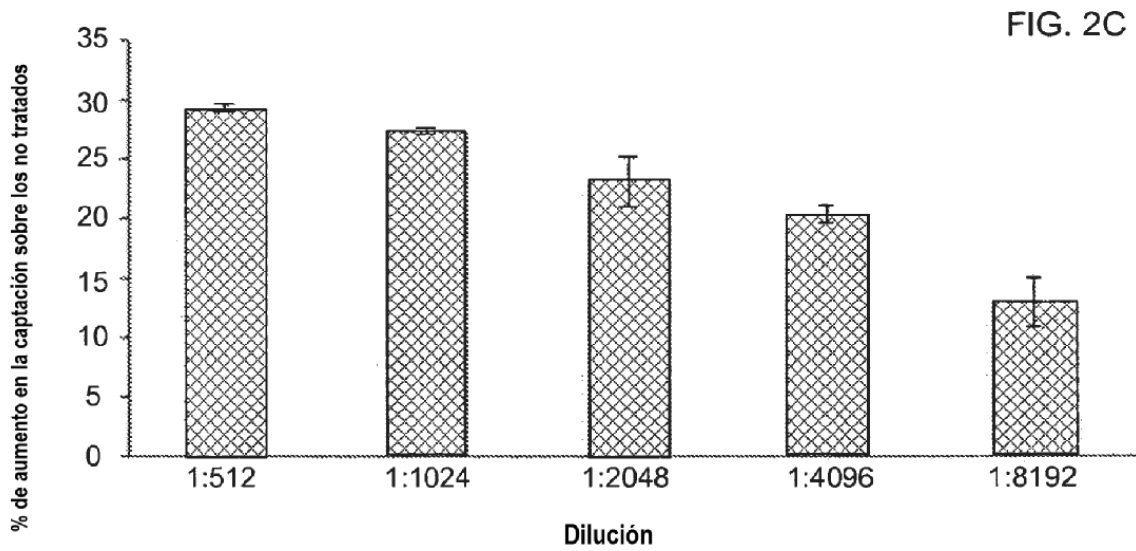
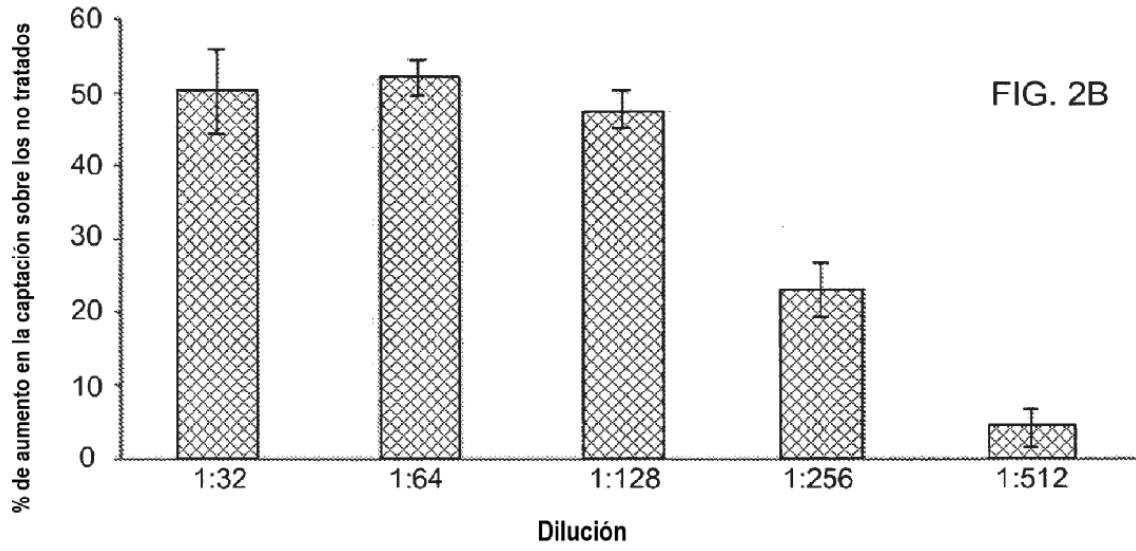
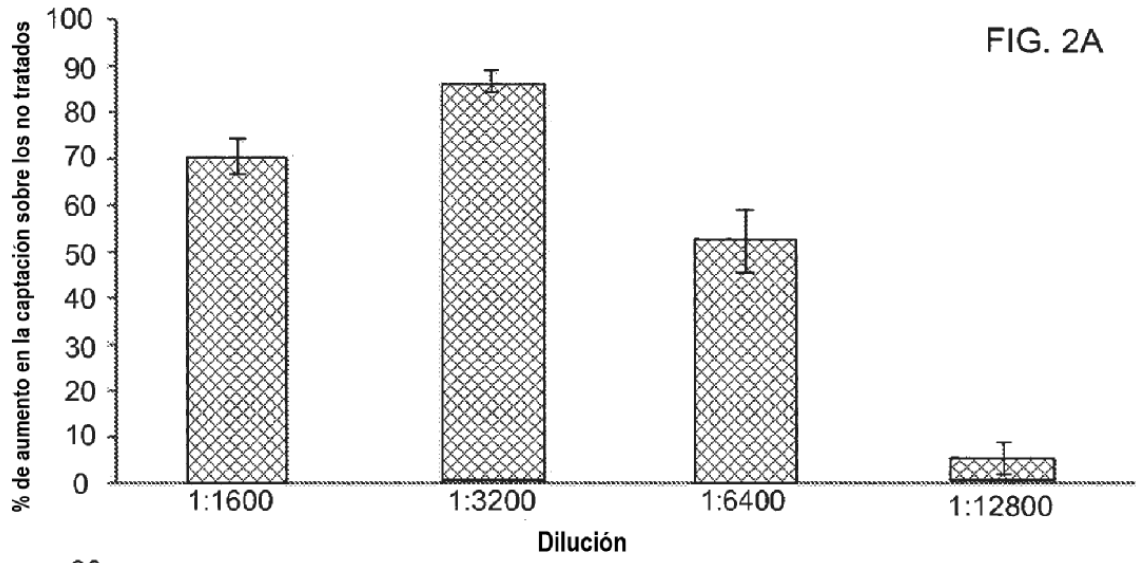
25 Gln Asp Thr Asn Ile Pro Ile Tyr Ala Gln Ile Phe
20 25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido P4 aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N° 1, para su uso en un método para tratar o prevenir una infección por patógeno potenciando la opsonofagocitosis de un patógeno de interés en un sujeto, comprendiendo el método:
- seleccionar un sujeto para tratamiento que tiene, o está en riesgo de desarrollar, una infección por un patógeno de interés;
- 10 administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido P4 aislado y uno o más anticuerpos opsónicos aislados exógenos o un fragmento de los mismos que se unen específicamente a un antígeno presente de la superficie del patógeno de interés, potenciando de este modo la opsonofagocitosis de un patógeno de interés.
- 15 2. Un péptido P4 aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N° 1, para su uso en un método para tratar y/o inhibir una infección por un patógeno de interés en un sujeto, comprendiendo el método:
- administrar al sujeto el péptido P4 aislado y uno o más anticuerpos opsónicos aislados o un fragmento de los mismos que se unen específicamente a un antígeno presente de la superficie del patógeno de interés, tratando y/o inhibiendo de este modo una infección por el patógeno de interés en el sujeto.
- 20 3. Un péptido P4 aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N° 1, para su uso en un método para tratar o prevenir una infección por patógeno potenciando la opsonofagocitosis de un patógeno de interés que no expresa la proteína adhesina A de superficie de neumococos (PsaA) en un sujeto, comprendiendo el método:
- seleccionar un sujeto para tratamiento que tiene, o está en riesgo de desarrollar, una infección por un patógeno de interés que no expresa la proteína adhesina A de superficie de neumococos (PsaA);
- 30 administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido P4 aislado, potenciando de este modo la opsonofagocitosis de un patógeno de interés.
- 35 4. El péptido P4 aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el método comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos opsónicos aislados exógenos o un fragmento de los mismos que se unen específicamente a un antígeno presente de la superficie del patógeno de interés.
- 40 5. El péptido P4 aislado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el péptido P4 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N° 1 o consta de la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N° 1.
- 45 6. El péptido P4 aislado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el método comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico para el patógeno de interés y, opcionalmente, en el que el antibiótico comprende ceftriaxona.
- 50 7. El péptido P4 aislado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el método comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína del complemento aislada o fragmento de la misma, en donde el fragmento de proteína del complemento es uno o más de C3a, C3b, iC3b, C3d, C4b o C5a.
- 55 8. El péptido P4 aislado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el patógeno de interés es un patógeno bacteriano de interés, un patógeno viral de interés o células infectadas por virus de interés, o un patógeno fúngico de interés.
9. El péptido P4 aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el patógeno bacteriano de interés es *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes* o *Staphylococcus aureus* y opcionalmente en el que el *Staphylococcus aureus* es *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA).
- 60 10. El péptido P4 aislado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el patógeno de interés es *Streptococcus pneumoniae*.
- 65 11. El péptido P4 aislado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el método comprende adicionalmente administrar uno o más anticuerpos opsónicos aislados exógenos adicionales que se unen específicamente a un antígeno presente de la superficie de uno o más patógenos adicionales de interés, potenciando de este modo la opsonofagocitosis de los patógenos adicionales de interés.

12. Una composición terapéutica que comprende,
una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido P4 aislado que comprende una secuencia de aminoácidos al
menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N° 1; y
una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos opsónicos aislados exógenos o un fragmento de los
5 mismos que se unen específicamente a un antígeno presente de la superficie de un patógeno de interés.
13. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el péptido P4 comprende la secuencia
de aminoácidos expuesta como SEC ID N° 1 o consta de la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID N° 1.
- 10 14. La composición terapéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 12 - 13 que comprende adicionalmente
una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico para el patógeno de interés, en la que el antibiótico es
preferiblemente ceftriaxona.
- 15 15. La composición terapéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 12 - 14, que comprende adicionalmente
una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína del complemento aislada o fragmento de la misma, en la que el
fragmento de proteína del complemento es uno o más de C3a, C3b, iC3b, C3d, C4b, o C5a.
- 20 16. La composición terapéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 12 - 15, en la que el patógeno de interés
es un patógeno bacteriano de interés, un patógeno viral de interés o un patógeno fúngico de interés.
- 25 17. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 16, en la que el patógeno bacteriano de interés es
Streptococcus pneumoniae, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis* o *Staphylococcus aureus* y,
opcionalmente, en la que el *Staphylococcus aureus* es *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA).
- 30 18. La composición terapéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 12 - 17, para su uso en la fabricación de un
medicamento para el tratamiento de una infección por el patógeno de interés.
19. La composición terapéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 12 - 17, para su uso en un método de
tratamiento de una infección por el patógeno de interés.





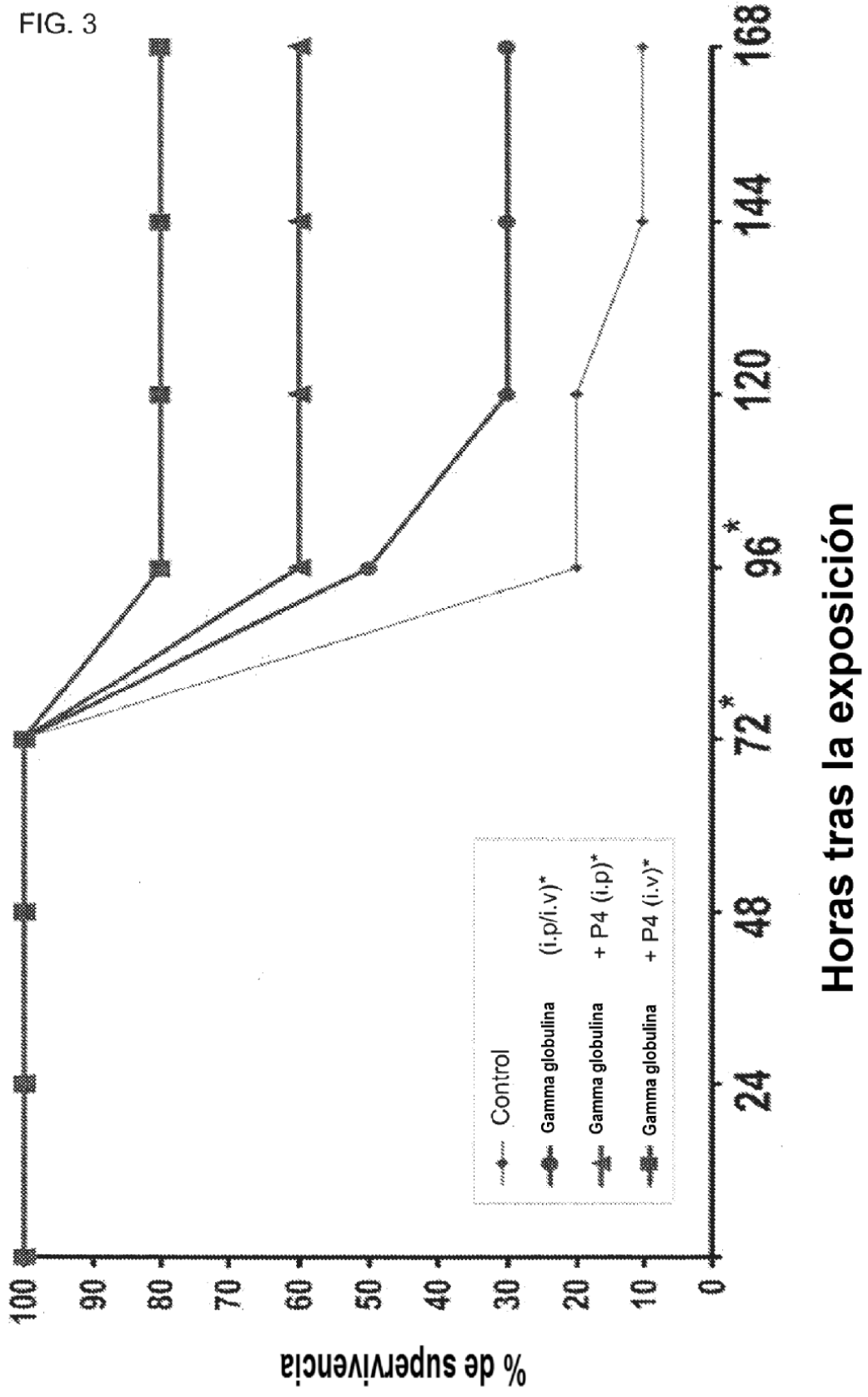


FIG. 4

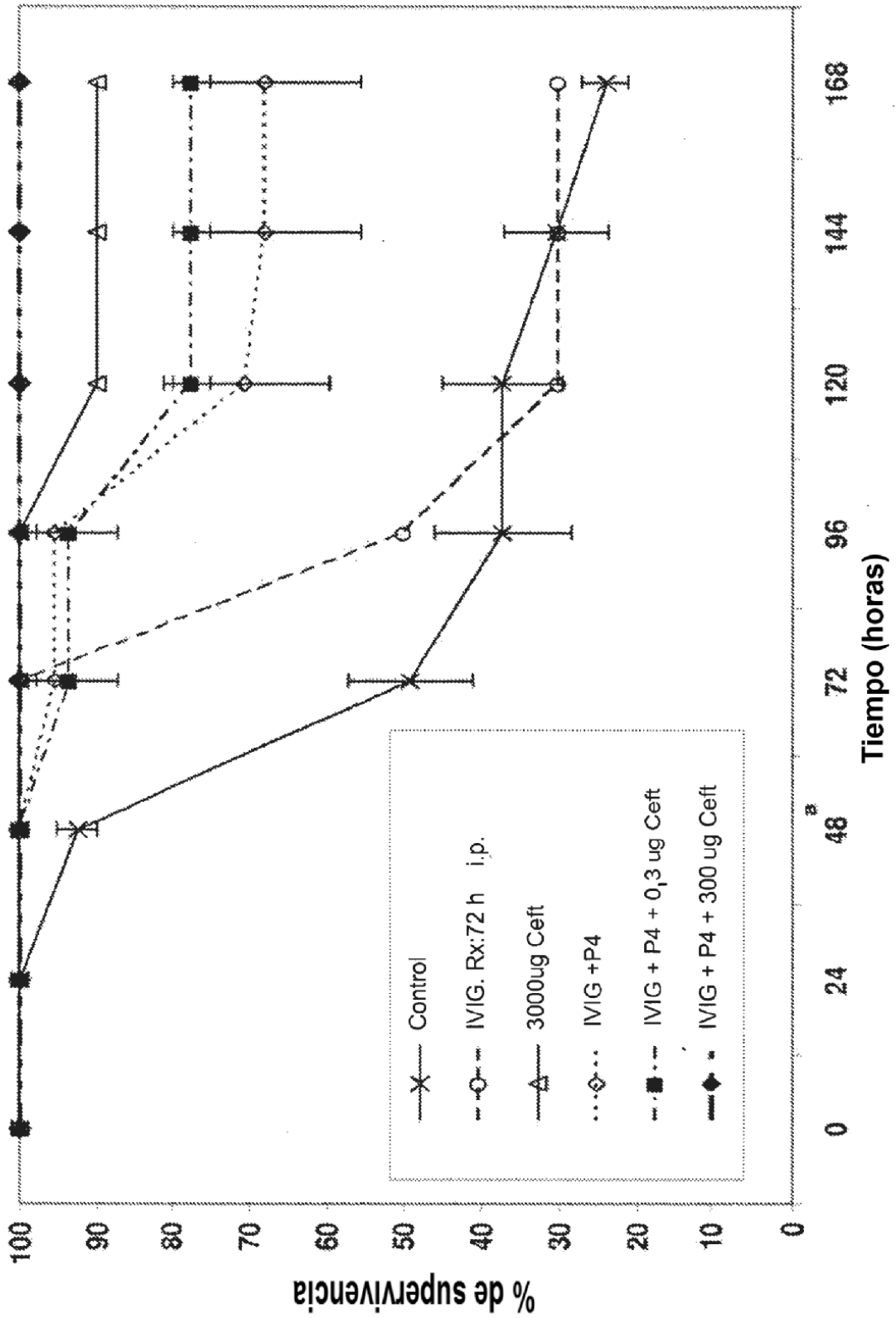


FIG. 5

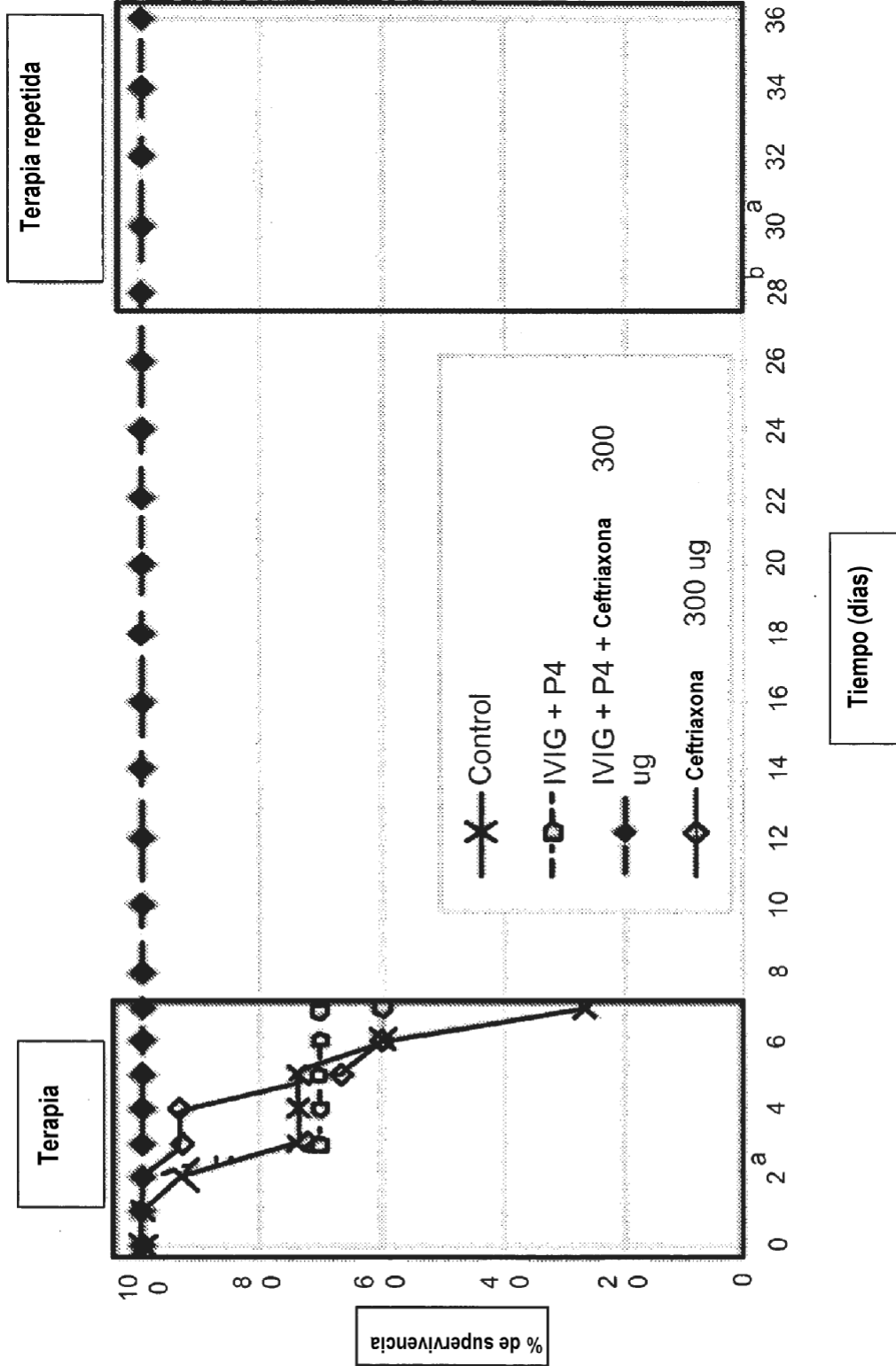


FIG. 6

