

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 434**

21 Número de solicitud: 201830793

51 Int. Cl.:

A61P 31/04 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

31.07.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

31.01.2020

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid ES y
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
(UAB) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FITA RODRIGUEZ, Ignacio;
APARICIO ALARCON , David;
QUEROL MURILLO , Enrique;
TORRES PUIG, Sergi;
QUIJADA PICH, Oscar y
PIÑOL RIBAS, Jaume**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Compuestos para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección de Mycoplasma sp.**

57 Resumen:

Compuestos para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección de Mycoplasma sp. La presente invención hace referencia a compuestos con capacidad para inhibir la adhesión celular de Mycoplasma sp. a la célula hospedadora para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección de Mycoplasma sp. o una enfermedad asociada a una infección de Mycoplasma sp. en un sujeto, que incluye análogos de oligosacáridos sialilados, péptidos que comprenden la secuencia Ser-Phe-ser y/o la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2) y anticuerpos contra dichos péptidos. La presente invención también proporciona un método para el cribado de compuestos útiles en el tratamiento y/o prevención de una infección por Mycoplasma sp., en particular, M. genitalium.

ES 2 739 434 A1

DESCRIPCIÓN**COMPUESTOS PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE UNA
INFECCIÓN DE MYCOPLASMA SP.**

5

La invención hace referencia a compuestos con capacidad para inhibir la adhesión celular de *Mycoplasma* sp. a la célula hospedadora para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección de *Mycoplasma* sp. o una enfermedad asociada a una infección de *Mycoplasma* sp. en un sujeto. La terapia anti-adhesión propuesta en la presente patente para *Mycoplasma* sp. comprende el uso de compuestos análogos del receptor o péptidos cortos correspondientes al sitio de unión de P110. Por tanto, la presente invención hace referencia al campo del tratamiento de infecciones bacterianas, principalmente, infecciones por *Mycoplasma* sp.

15 ESTADO DEL ARTE

Los patógenos bacterianos dependen de estructuras superficiales dedicadas capaces de mediar en la adhesión específica o no específica a receptores diana hospedadores para desarrollar con éxito las infecciones. Los ácidos siálicos son carbohidratos hidrófilos con carga negativa que ocupan posiciones externas en las superficies de mucosas y sialoglicoproteínas secretadas de células eucariotas. Dada su accesibilidad y distribución ubicua, una variedad de estrategias microbianas se dirigen a los ácidos siálicos hospedadores para su adherencia, mimetismo y degradación. En lo que se refiere a la adhesión, se conoce que la adhesina SabA de la *Helicobacter pylori* o las adhesinas estreptocócicas filogenéticamente relacionadas GspB, Hsa y SrpA se enlazan a ligandos sialilados. De forma similar, se ha mostrado que diversas especies de *Mycoplasma* interactúan con glicoproteínas sialiladas y es algo sólidamente establecido que el patógeno respiratorio *Mycoplasma pneumoniae* se une a los eritrocitos humanos a través de oligosacáridos sialilados de tipo li.

30

Los micoplasmas son los microorganismos auto-replicantes más pequeños y presentan propiedades únicas entre los procariontes, tales como (i) su necesidad de colesterol para mantener la envoltura de la membrana y (ii) la ausencia de una pared externa. Se sabe que los micoplasmas causan infecciones pulmonares en humanos. Además, es ampliamente conocido que los micoplasmas causan enfermedad en la mayoría de los animales, incluyendo animales de importancia comercial para la industria de explotación de ganado,

35

tales como bovino, porcino y aviar. Sin embargo, hasta ahora, los mecanismos empleados por estos microorganismos para colonizar a sus huéspedes y subvertir el sistema inmune aún no se entienden bien. Es digno de atención que diversas especies de micoplasmas invaden sus células diana y sobreviven dentro del entorno intracelular, que proporciona un refugio seguro ante las defensas del huésped y los antibióticos.

El *Mycoplasma genitalium* es un patógeno facultativo intracelular implicado en patologías urogenitales tales como la uretritis en hombres y la cervicitis o enfermedad inflamatoria pélvica en mujeres. Se prevé que la *M. genitalium* interactúe con los receptores de la célula hospedadora previamente a la invasión celular. Notablemente, la localización intracelular explica el frecuente fracaso del tratamiento con antibióticos para controlar las infecciones de este patógeno de transmisión sexual clínicamente importante. La reticencia al tratamiento antibiótico y la rápida aparición de la resistencia a los antibióticos, alientan el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. En este sentido, una mejor comprensión de los mecanismos de la citoadherencia podría facilitar la implementación de aproximaciones antimicrobianas más efectivas basadas en terapias anti-adhesión.

Las principales citoadhesinas de *M. genitalium*, P140 (1444 residuos) y P110 (1052 residuos) muestran una extensa reactividad cruzada con las principales citoadhesinas de *M. pneumoniae*, concretamente P1 y el par P90/P40, respectivamente. Se ha mostrado que la P140 y P110 se estabilizan recíprocamente e interactúan para formar un complejo transmembrana denominado NAP que se acumula en una estructura polar conocida como orgánulo terminal. Se prevé que el NAP contribuye decisivamente a la adherencia y la movilidad por deslizamiento (del inglés “*gliding motility*”) en micoplasmas del complejo *pneumoniae*. Además de su función en la adherencia y movimiento, la P140 y P110 están también implicadas en la duplicación del orgánulo terminal durante la división celular. De forma notable, estas citoadhesinas constituyen la principal diana de los anticuerpos del huésped durante la infección y el *M. genitalium* ha desarrollado una estrategia refinada para generar variantes antigénicas de estas dos proteínas inmunodominantes. Dispersas por todo el genoma, el *M. genitalium* comprende nueve regiones de repetición del ADN, designadas como MgPar, que contienen secuencias con homología con los genes de las citoadhesinas. La recombinación entre los genes de citoadhesinas y las secuencias MgPar homólogas, proporciona una colección virtualmente ilimitada de variantes antigénicas.

La solicitud de patente europea EP1833493A1 divulga composiciones y métodos para inhibir la adherencia de microorganismos patógenos a las células. La composición incluye

polímeros solubles en agua PEO/PEG que pueden ser copolímeros en bloque hidrófilos o anfífilos. El microorganismo patógeno puede ser un patógeno bacteriano, fúngico, vírico o de tricomonas, y la composición evita la adherencia del microorganismo patógeno en, por ejemplo, el tracto urogenital de un mamífero y ayuda a reducir la generación de mal olor.

5

La solicitud internacional WO0202050A1 divulga métodos y composiciones para la prevención y tratamiento de trastornos causados por infección por micoplasmas basados en la administración de una cantidad efectiva de un agente que evita o inhibe la infección por micoplasmas eliminando los residuos de ácido siálico, tales como la enzima neuraminidasa
10 o una enzima trans-sialidasa. La eliminación del ácido siálico inhibe o evita la unión del micoplasma a las células hospedadoras.

Sin embargo, los mecanismos empleados por estos microorganismos para colonizar a sus huéspedes y subvertir el sistema inmune aún no se entienden bien. Hasta la fecha, no existe
15 aún ningún tratamiento efectivo para bloquear las primeras etapas de la infección por *Mycoplasma sp.*, en particular, *M. genitalium*. Por lo tanto, aún se considera que existe una gran necesidad de nuevas estrategias para controlar las infecciones por micoplasmas, y de proporcionar nuevos tratamientos efectivos contra estos microorganismos.

20 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los micoplasmas se encuentran entre los patógenos que tienen más éxito, los cuales establecen interacciones íntimas con células epiteliales y causan enfermedades crónicas en humanos y en una amplia variedad de animales. Sin embargo, hasta ahora, los mecanismos
25 para colonizar sus huéspedes y subvertir el sistema inmune no se conocen bien.

Los autores de la presente invención han determinado la estructura cristalina de la adhesina P110 del *M. genitalium* (número de acceso de UnitProt P22747 entrada 87, SEQ ID NO: 1), y han identificado el dominio de unión de esta adhesina a los receptores sialilados de la
30 célula hospedadora. Han observado que el tripéptido Ser456-Phe457-Ser458, situado en el sitio de unión del receptor de la adhesina P110, es responsable de la interacción entre el receptor sialilado y la adhesina P110, y que esta interacción ocurre mediante una fracción de ácido neuramínico, además de interacciones específicas que implican a los residuos Pro197-Ser198-Pro199-Asn200 (SEQ ID NO: 2) de la SEQ ID NO: 1.

35

SEQ ID NO: 1:

Swiss-Prot|P22747|Release 2015_11/2015_11|11-Nov-2015
MKTMRKQIYKKAYWLLLLPFLPLALANTFLVKEDSKNVTAYTPFATPITDSKSDLV
SLAQLDSSYQIADQTIHNTNLFVLFKSRDVKVKYESSGSNNISFDSTSQGEKPSY
VVEFTNSTNIGIKWTMVKKYQLDVPNVSSDMNQVLKNLILEQPLTKYTLNSSLAK
5 EKGKTQREVHLGSGQANQWTSQRNQHDLNNNPSPNASTGFKLTTGNAYRKLSESW
PIYEPIDGTKQKGKGDSSGWSSTEENEAKNDAPSVSGGGSSSGTFNKYLNTKQAL
ESIGILFDDQTPRNVITQLYYASTSKLAVTNNHIVVMGNSFLPSMWWYVVVERSAQ
ENASNKPTWFANTNLDWGEDKQKQFVENQLGYKETTSTNSHNFHKSFTQPAYLI
SGIDSVNDQIIFSGFKAGSVGYDSSSSSSSSSSSTKDQALAWSTTTSLDSKTGYK
10 DLVTNDTGLNGPINGSFSIQDTFSFVVPYSGNHTNNGTTGPIKTAYPVKKDQKST
VKINSLINATPLNSYGDEGIGVFDALGLNYNFKSNQERLPSRTDQIFVYGIVSPN
ELRSKSSADSTGSDTKVNWNSNTQSRYLPPVNYSEGIIDADGFKRPENRGASVT
TFSGLKSIAPDGFANSIANFSVGLKAGIDPNPVMMSGKKANYGAVVLTRGGVVRLN
FNPGNDSLSTTDNNIAPISFSFTPFTAESAVALDITTFKEVTYNQESGLWSYIFD
15 SSLKPSHDGKQTPVTDNMGFSVITVSRGTGIELNQDQATTTLDVAPSALAVQSGIQ
STTQTLTGVLPLSEEFSAVIKDSQNKIDIDYKNNNGLFEIDTQLSNSVATNNGG
LAPSYTENRVDAGKVEFADNSVLQARNLVDKTVDEIINTPEILNSFFRFTPAFE
DQKATLVATKQSDTSLVSPRIQFLDGNFYDLNSTIAGVPLNIGFPSRVFAGFAA
LPAWVIVPSVSGSSVGILFILLVLGLGIGIPMYRVRKLDASFVNVFKKVDTLTTA
20 VGSVYKKIITQTVGVKKAPSALKAAANPSVKKPAAFLKPPVQPPSKPEGEQKAVEV
KSEETKS

En vista del descubrimiento anteriormente mencionado, la presente invención propone como una buena diana para parar o atenuar la infección, unas moléculas solubles que podrían unirse (con una afinidad muy elevada) a las proteínas de adhesión bacteriana (adhesinas), compitiendo consecuentemente con la unión de los receptores humanos. En el caso de *M. genitalium*, estas moléculas solubles pueden ser unos compuestos a base de ácido siálico, tales como 3-sialilactosa y 6-sialilactosa, tal como se ha probado en los ejemplos de la presente descripción. Por lo tanto, la terapia anti-adhesión propuesta en la presente patente para *M. genitalium* comprende la utilización de compuestos análogos de receptores, a menudo denominados glicomiméticos, que comprenden grupos de ácido siálico monoméricos o bien multiméricos. De forma alternativa, también se propone en la presente patente una terapia anti-adhesión centrada en péptidos cortos, o en compuestos similares a péptidos, que corresponden al sitio de unión al receptor de la P110 el cual, tal como ha sido divulgado en el párrafo anterior, ha sido dilucidado en la presente invención. Estos péptidos cortos, imitando parcialmente el sitio de unión, podrían competir con la unión de las adhesinas de *M. genitalium*.

En base a los descubrimientos anteriores, los inventores han desarrollado un conjunto de aspectos inventivos que serán divulgados a continuación.

40

Uso de la invención

En un aspecto, la presente invención hace referencia a un compuesto con capacidad para inhibir la adhesión celular de *Mycoplasma* sp. a la célula hospedadora en el tratamiento y/o

prevención de una infección de *Mycoplasma* sp. o una enfermedad asociada a una infección de *Mycoplasma* sp. en un sujeto. A partir de aquí, el compuesto con capacidad para inhibir la adhesión celular de *Mycoplasma* sp. a la célula hospedadora se denomina “compuesto de la invención”. Tal como se utiliza en la presente patente, el compuesto de la invención es un
5 compuesto soluble en agua.

Tal como se utiliza en la presente patente, la expresión “capacidad para inhibir la adhesión celular” significa que el microorganismo (en la presente invención, *Mycoplasma* sp., en particular, *M. genitalium*) no puede unirse al receptor de la célula hospedadora (en la
10 presente invención, un ácido siálico que comprende una fracción de ácido neuramínico), y colonizar la célula. Por tanto, debido a su capacidad de inhibir la adhesión celular de *Mycoplasma* sp., el compuesto de la invención es también denominado “compuesto anti-adhesión”.

15 Tal como se ha explicado anteriormente, la interacción entre la *Mycoplasma* sp. y el receptor de la célula hospedadora ocurre a través del sitio de unión al receptor de la adhesina P110 y la fracción de ácido neuramínico presente en los oligosacáridos sialilados del receptor hospedador. Los inventores han observado que la cavidad de unión al ácido siálico identificada en la P110 comprende el tripéptido Ser456-Phe457-Ser458, además de
20 interacciones específicas que implican a los residuos Pro197-Ser198-Pro199-Asn200 (SEQ ID NO: 2). Por tanto, en una realización en particular, el compuesto se une al sitio de unión al receptor de la adhesina P110 de *Mycoplasma genitalium*, donde dicho sitio de unión al receptor comprende la secuencia Ser-Phe-Ser y/o la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2).

25 Los compuestos capaces de unirse al sitio de unión al receptor de la adhesina P110 son aquellos compuestos análogos a los oligosacáridos sialilados del receptor hospedador. El término “oligosacárido sialilado” significa un oligosacárido que tiene un residuo de ácido siálico.

30 Ácido siálico es un término genérico para los derivados de ácido neuramínico sustituidos con N- u O-, un monosacárido con una cadena principal de nueve carbonos. Es también el nombre para el elemento más común de este grupo, ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac o NANA). Los ácidos siálicos se encuentran ampliamente distribuidos en tejidos animales y en
35 menor grado en otros organismos, que se encuentran en un rango de plantas y hongos a levaduras y bacterias, mayoritariamente en glicoproteínas y gangliósidos (estos tienen lugar

al final de las cadenas de azúcar conectadas a las superficies de células y proteínas solubles). La familia de ácido siálico incluye 43 derivados del ácido neuramínico, un azúcar de nueve carbonos, pero estos ácidos inusualmente aparecen libres en la naturaleza. Normalmente, pueden encontrarse como componentes de cadenas de oligosacáridos de mucinas, glicoproteínas y glicolípidos que ocupan posiciones terminales, no reductoras de carbohidratos complejos en áreas de membrana tanto externas como internas donde se encuentran muy expuestos y desarrollan importantes funciones. El ácido siálico es sintetizado por glucosamina 6 fosfato y acetil-CoA a través de una transferasa, lo que da como resultado N-acetilglucosamina-6-P. Esta se convierte en N-acetilmannosamina-6-P a través de epimerización, que reacciona con fosfoenolpiruvato produciendo N-acetilneuramínico-9-P (ácido siálico). Para que se vuelva activo para entrar en el proceso de biosíntesis de oligosacáridos de la célula, se añade un nucleósido monofosfato, que procede de un trifosfato de citidina, convirtiendo el ácido siálico en monofosfato de citidina-ácido siálico (CMP-ácido siálico). Este compuesto se sintetiza en el núcleo de la célula animal. En sistemas bacterianos, los ácidos siálicos son biosintetizados por una enzima aldolasa. La enzima utiliza un derivado de la manosa como un sustrato, insertando tres carbonos de piruvato en la estructura de ácido siálico resultante. Estas enzimas pueden ser utilizadas para la síntesis quimioenzimática de derivados del ácido siálico.

En otra realización en particular, el compuesto es un análogo del receptor de la célula hospedadora de la adhesina P110 de *M. genitalium*, donde dicho compuesto comprende grupos de ácido siálico monoméricos o bien multiméricos.

En el contexto de la presente invención, el término “análogo” significa que un compuesto dado tiene propiedades físicas, químicas, y/o bioquímicas similares a un oligosacárido sialilado y consecuentemente muestran actividades biológicas similares a las de los oligosacáridos sialilados descritos en la presente patente (es decir, para actuar como receptor de la adhesina P110 de *M. genitalium*). Un ensayo de utilidad para evaluar si un compuesto determinado es un análogo de oligosacáridos sialilado es, por ejemplo, un kit de ensayo de ácido siálico. Entre los ejemplos de análogos de oligosacáridos sialilados se incluyen, sin limitarse a, polímeros dendríticos conjugados con ácido siálico no tóxicos, derivados de ácido siálico con enlace covalente que incluyen grupos fenil- o metil-umbeliferilo, dendrímero PAMAM de ácido siálico, Peramivir, Tamifosfor, Oseltamivir, Zanamivir, y Laninamivir, entre otros. En una realización más particular, el análogo es un oligosacárido, preferiblemente, dicho análogo es 3-sialilactosa (3SL) o 6-sialilactosa (6SL).

De acuerdo con la invención, el oligosacárido sialilado se selecciona del grupo que comprende 3'-sialilactosa y 6'-sialilactosa. Las formas 3'- y 6'- de sialilactosa pueden ser aisladas por tecnología cromatográfica o de filtración de una fuente natural tal como leches de origen animal. De forma alternativa, pueden producirse por medios biotecnológicos
5 utilizando sialitransferasas o sialidasas específicas, neuraminidasas, o bien por una tecnología de fermentación basada en enzimas (enzimas naturales o recombinantes), por síntesis química o mediante tecnología de fermentación microbiana. En este último caso, los microbios pueden bien expresar sus enzimas y sustratos naturales, o bien pueden ser modificados por ingeniería genética para producir respectivos sustratos y enzimas. Pueden
10 utilizarse cultivos microbianos únicos o cultivos mezclados. La formación de sialil-oligosacáridos puede ser iniciada por sustratos aceptores comenzando a partir de cualquier grado de polimerización (DP), desde DP=1 en adelante. De forma alternativa, las sialilactosas pueden ser producidas por síntesis química a partir de lactosa y ácido N'-acetilneuramínico libre (ácido siálico). Las sialilactosas se encuentran también
15 comercialmente disponibles, por ejemplo, de Kyowa Hakko Kogyo de Japón.

De forma alternativa, la inhibición de la adhesión celular de *Mycoplasma* sp. a la célula hospedadora puede lograrse por un compuesto, que reconoce específicamente y se une al sitio de unión al receptor de la adhesina P110, es decir, que específicamente reconoce y se
20 une al tripéptido Ser456-Phe457-Ser458 o al péptido Pro197-Ser198-Pro199-Asn (SEQ ID NO: 2). La unión de este compuesto al sitio de unión al receptor de la adhesina P110 evita que el receptor de la célula hospedadora de *Mycoplasma* sp., es decir, el oligosacárido sialilado, sea reconocido por la adhesina P110 del Micoplasma. De esta forma, se inhibe la adhesión de *Mycoplasma* sp. y el receptor de la célula hospedadora. Por tanto, la presente
25 invención también abarca un compuesto que específicamente reconoce y se une a la secuencia Ser-Phe-Ser o a la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2) para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por una infección de *Mycoplasma* sp. en un sujeto. En una realización en particular, el compuesto específicamente reconoce y se une a la secuencia Ser-Phe-Ser or Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2). Ejemplos de estos
30 compuestos incluyen, sin limitarse a, péptidos y anticuerpos que específicamente reconocen y se unen a la secuencia Ser-Phe-Ser o a la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2).

En una realización en particular, el compuesto para su uso de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo, o un fragmento del mismo, que específicamente reconoce y se
35 une a la secuencia Ser-Phe-Ser o a la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2), de aquí en adelante "anticuerpo de la invención".

Un “anticuerpo” (utilizado de forma intercambiable en forma plural) es una molécula de inmunoglobulina capaz de una unión específica a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento del
5 antígeno, situado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se utiliza en la presente patente, el término “anticuerpo” abarca no solamente anticuerpos policlonales o monoclonales intactos (por ejemplo, de longitud completa), sino también fragmentos de unión al antígeno de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), de cadena única (scFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una
10 parte de anticuerpo, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena única, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad requerida, incluyendo variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de
15 secuencias de aminoácidos de anticuerpos, y anticuerpos modificados de forma covalente. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgD, IgE, IgG, IgA, o IgM (o sub-clases de los mismos), y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase en particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, pueden asignarse inmunoglobulinas a diferentes clases. Existen cinco
20 clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas pueden además dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma, y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de
25 inmunoglobulinas son bien conocidas.

El término “fragmento de unión al antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “fragmento de anticuerpo”), tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a uno o más fragmentos de un anticuerpo que mantienen la capacidad de unirse específicamente a un
30 antígeno (por ejemplo, la secuencia Ser-Phe-Ser o la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2)). Se ha mostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Dichas realizaciones de anticuerpos pueden además ser formatos biespecíficos, doble específicos, o multi-
35 anticuerpos multi-específicos, doble específicos, y biespecíficos se conocen bien en el arte y se encuentran descritos en Kontermann (ed.), *Bispecific Antibodies*, Springer, NY (2011), y

Spiess C et al. (2015) *Mol Immunol* 67(2 Pt A):95-106. Entre los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “parte de unión al antígeno” de un anticuerpo se incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward ES et al. (1989) *Nature* 341(6242):544-546; WO 90/05144 A1 incorporado en la presente patente a modo de referencia), que comprende un único dominio variable; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes independientes, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, por un conector sintético que les permite que sean realizados como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); ver, por ejemplo: Bird RE et al. (1988) *Science* 242(4877):423-426; Huston JS et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(16):5879-5883. Dichos anticuerpos de cadena única también pretenden ser abarcados dentro del término “parte de unión al antígeno” de un anticuerpo. Otras formas de anticuerpos de cadena única, tales como diacuerpos también se encuentran incluidos. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos y bivalentes en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, pero que utilizan un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de ese modo que los dominios se apareen con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (ver por ejemplo, Holliger P et al. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(14):6444-6448; Poljak RJ et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123). Dichas partes de unión del anticuerpo son conocidas en el arte (Kontermann y Dubel eds., *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

Existen numerosos métodos que pueden ser utilizados para obtener anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, de la invención. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser producidos utilizando métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales pueden además ser producidos por generación de hibridomas (ver por ejemplo, Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256(5517):495-497) de acuerdo con métodos conocidos. Los hibridomas formados de esta manera son cribados utilizando métodos estándar, tales como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) y análisis de resonancia de plasmones superficiales (por ejemplo, OCTET o BIACORE), para identificar uno o más hibridomas que producen un

anticuerpo que se une específicamente a un antígeno específico. Cualquier forma del antígeno específico puede ser utilizada como el inmunógeno, por ejemplo, un antígeno recombinante, formas de origen natural, cualquier variante o fragmentos del mismo, además de un péptido antigénico del mismo (por ejemplo, cualquiera de los epítomos descritos en la presente patente como un epítomo lineal o dentro de un supercántigo (scaffold) como un epítomo conformacional). Un ejemplo de método para producir anticuerpos incluye el cribado de las genotecas de expresión de proteínas que expresan anticuerpos o fragmentos de los mismos (por ejemplo, scFv), por ejemplo, genotecas de expresión en fago o presentación en ribosomas (del inglés *phage display* y *ribosome display*, respectivamente). La expresión en fago o *phage display* se describe, por ejemplo, en: la Patente de EE.UU. nº 5,223,409; Smith GP (1985) *Science* 228(4705):1315-1317; Clackson T et al. (1991) *Nature* 352(6336):624-628; Marks JD et al. (1991) *Journal of molecular biology* 222(3):581-597); WO92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; y WO 90/02809. Además del uso de genotecas de expresión, el antígeno específico (por ejemplo, el péptido de la invención) puede ser utilizado para inmunizar un animal no humano, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón, hámster o rata. En una realización en particular, el animal no humano es un ratón. Se obtiene un anticuerpo monoclonal del animal no humano, y a continuación se modifica, por ejemplo, uno quimérico, utilizando técnicas de ADN recombinante adecuadas. Una variedad de aproximaciones para producir anticuerpos quiméricos han sido descritas. Ver, por ejemplo, Morrison SL et al. (1984) *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(21):6851-6855; Takeda S et al. (1985) *Nature* 314(6010):452-454; Patente de EE.UU. Nº 4,816,567; Patente de EE.UU. Nº 4,816,397; EP171496; EP0173494; GB 2177096B. Para técnicas de producción adicionales, ver *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. La presente divulgación no se encuentra necesariamente limitada a cualquier fuente, método de producción u otras características especiales en particular de un anticuerpo.

De forma alternativa, la inhibición de la adhesión celular de *Mycoplasma* sp. a la célula hospedadora puede lograrse mediante un compuesto, tal como un péptido, que imita el sitio de unión al receptor de la adhesina P110. Tal como se ha explicado previamente, los inventores han observado que el sitio de unión al receptor de la adhesina P110 comprende el tripéptido Ser456-Phe457-Ser458, además de las interacciones específicas que implican a los residuos Pro197-Ser198-Pro199-Asn (SEQ ID NO: 2). Por tanto, en otra realización en particular, el compuesto para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por una infección de *Mycoplasma* sp. en un sujeto, es un péptido, de aquí en adelante "péptido de la invención", que comprende la secuencia Ser-Phe-Ser y/o la

secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2). En otra realización más particular, el péptido consiste en la secuencia Ser-Phe-Ser y/o la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2). En otra realización en particular, el péptido de la invención no comprende la secuencia de longitud completa de la adhesina P110 de *M. genitalium* (SEQ ID NO: 1). El péptido de la invención imita el sitio de unión al receptor de la adhesina P110 y compite con el sitio de unión al receptor natural de *Mycoplasma* sp. para el receptor de la célula hospedadora, es decir, los oligosacáridos sialilados. Más adelante, bajo el encabezado “péptido de la invención”, se proporciona una descripción detallada del péptido de la invención. En una realización en particular, el péptido de la invención comprende 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más D-aminoácidos. En una realización en particular, el péptido consiste en menos de 90, menos de 80, menos de 70, menos de 60, menos de 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20 o menos de 10 residuos de aminoácidos. En una realización en particular, el péptido de la invención es de entre 3 y 50 aminoácidos de longitud, preferiblemente entre 3 y 40, más preferiblemente entre 3 y 30, incluso más preferiblemente entre 3 y 20. En una realización en particular, el péptido es de entre 3 y 15 aminoácidos de longitud. En otra realización en particular, el péptido es de entre 4 y 8 aminoácidos de longitud.

El compuesto divulgado en la presente invención, con capacidad de inhibir la adhesión celular de *Mycoplasma* sp. a la célula hospedadora, se utiliza en el tratamiento y/o la prevención de una infección de *Mycoplasma* sp. o una enfermedad causada por una infección de *Mycoplasma* sp. en un sujeto.

En el contexto de la presente invención, el término “tratamiento” hace referencia a cualquier proceso, acción, aplicación, terapia o similar, en donde se proporciona a un sujeto (o paciente), incluyendo un ser humano, ayuda médica con el objeto de mejorar la condición del sujeto, directamente o indirectamente, o ralentizar la progresión de una condición o trastorno en el sujeto, o mejorar al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno en tratamiento. En la presente invención, la condición o trastorno es una infección de *Mycoplasma* sp. o una enfermedad asociada a una infección de *Mycoplasma* sp.

La presente invención comprende la administración de una cantidad efectiva de un compuesto que evita o disminuye una infección por micoplasmas. Preferiblemente, cuando ya existe la infección por micoplasmas, el nivel de infección resulta disminuido en al menos un diez por ciento. El nivel de infección puede medirse por el número de organismos de micoplasmas presentes en una muestra de tejido o de fluidos, por la reacción inmune hacia el micoplasma en el sujeto, o por medio de cualquier ensayo de laboratorio estándar para el

diagnóstico de micoplasmas y/o otros ensayos estándar para el diagnóstico de microorganismos que no son micoplasmas que están asociados con los micoplasmas.

En el contexto de la presente invención, el término “prevención” hace referencia a la capacidad del compuesto de la invención para evitar, minimizar o impedir la progresión de una enfermedad o trastorno en el sujeto. En la presente invención, la condición o trastorno es una infección de *Mycoplasma* sp. ó una enfermedad asociada a una infección de *Mycoplasma* sp.

El término “micoplasma” tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a micoplasmas capaces de infectar a un huésped humano y/o no humano. Cuando el huésped es un humano, el micoplasma puede ser, por ejemplo, pero no a modo de limitación, *Mycoplasma buccale*, *M. faucium*, *M. fermentans*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. lipophilum*, *M. oral*, *M. penetrans*, *M. pneumoniae*, *M. hyopneumoniae*, *M. salivarium* o *M. spermatophilum*. En una realización en particular, el microorganismo micoplasma es *M. genitalium*.

La infección por micoplasma puede estar asociada con la proliferación de micoplasmas y/o la fusión con otros microorganismos como clamidias, arqueas y espiroquetas que inducen trastornos de un aumento de la proliferación celular, lo que conduce a alteraciones en el tejido con inflamación y/o fibrosis y/o calcificación y/o engrosamiento de la membrana basal, causando de este modo diversas enfermedades tales como, por ejemplo, pero no de forma exclusiva, estenosis de las válvulas cardíacas, úlceras cutáneas, osteoartritis, glomerulonefritis, hepatitis, enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedades de esclerosis cerebral crónica, etc. Los trastornos caracterizados por la alteración del tejido por fibrosis y/o calcificación debido a la proliferación no deseada de microorganismos asociados con *Mycoplasma* sp. incluyen enfermedad vascular inflamatoria linfocítica, granulomatosa o no, con etiología no estable (por ejemplo, Síndrome de Takayasu, arteritis de células gigantes, granulomatosis de Wegener, tromboangitis obliterante); glomerulopatías primarias o secundarias de etiología no definida (como ejemplo glomerulonefritis membranoproliferativa, glomerulonefritis rápidamente progresiva, glomerulonefritis membranosa, nefrosis lipoide, glomeruloesclerosis glomeruloesclerosis segmentaria y focal, otras glomerulonefritis proliferativas, glomerulonefritis crónica, y glomerulonefritis asociada a enfermedades sistémicas tales como la diabetes mellitus, lupus eritematoso sistémico, enfermedades malignas, Poliarteritis nodosa, Síndrome de Goodpasture, Púrpura de Henoch-Schönlein, etc.) y, pero sin limitarse a, lesiones fibrosas, calcificadas y/o osificantes,

- con inflamación (como, por ejemplo, estenosis de la válvula aórtica (degenerativa) o la mitral por etiología reumática, pericarditis y pleuritis con fibrosis y calcificación, osteoartritis, artritis reumatoide, espondiloartropatías seronegativas, artropatía de Lyme, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, colagenosis, etc), enfermedades inflamatorias intestinales de etiología no bien establecida (como, por ejemplo, pero sin limitarse a, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Whipple, gastritis, etc.), enfermedades inflamatorias del tracto respiratorio de etiología no bien establecida (como ejemplo el síndrome disneico agudo del adulto, síndrome de Goodpasture, asma, etc.), esclerosis múltiple, neoplasias y alopecia.
- 5
- 10 El compuesto de la invención puede ser utilizado para prevenir y/o tratar trastornos asociados con infección por micoplasmas y/o co-infección y/o fusión de micoplasmas con otros microbios, donde el microbio puede ser un virus (por ejemplo, el virus de inmunodeficiencia humano, virus de la hepatitis, citomegalovirus, virus del papiloma humano, virus de Epstein-Barr) o bacterias (como, por ejemplo, clamidia, espiroqueta como
- 15 *Borrelia* sp, *Helicobacter pylori*, etc) o arqueas (descritas anteriormente en la presente invención). La cantidad de administración del compuesto es una cantidad suficiente para inhibir o prevenir la adhesión y/o infección de micoplasmas y los microorganismos asociados con los mismos en al menos un 10%.
- 20 La caquexia es una de las complicaciones más preocupantes de las neoplasias malignas y otras diversas enfermedades crónicas. La caquexia presente en diversas enfermedades crónicas, tales como cáncer, artritis reumatoide, insuficiencia cardíaca, entre otras está asociada con el aumento de la expresión en el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) en el flujo sanguíneo, además de otras citotoxinas. Se conoce en la literatura que los
- 25 micoplasmas están asociados con el aumento de la producción de alfa-TNF y otras citotoxinas por la célula hospedadora.

Estudios epidemiológicos, genéticos y moleculares sugieren que la infección por micoplasmas y la inflamación inician ciertos tipos de cáncer, tales como:

- 30 - Cáncer de colon: En un estudio para entender los efectos de la contaminación por Micoplasmas sobre la calidad de células de cáncer de colon humanas cultivadas, se encontró una correlación positiva entre el número de células de *M. hyorhinis* presentes en la muestra y el porcentaje de células positivas en CD133 (una glicoproteína con una función desconocida).

- Cáncer gástrico: Una fuerte evidencia indica que la infección de *M. hyorhinitis* contribuye al desarrollo del cáncer dentro del estómago y aumenta la probabilidad del desarrollo de células cancerígenas malignas.
- 5 - Cáncer de pulmón: Estudios sobre el cáncer de pulmón han apoyado la creencia de que existe más de una correlación positiva coincidente entre la aparición de cepas de Micoplasmas en pacientes y la infección con tumorigénesis.
- Cáncer de próstata: se ha observado que la p37, una proteína codificada por *M. hyorhinitis*, promueve la tendencia a la invasión de las células de cáncer de próstata. La proteína también causa que el crecimiento, la morfología y la expresión génica de
10 las células cambie, causando que se conviertan en un fenotipo más agresivo.
- Cáncer renal: Los pacientes con carcinoma de células renales (CCR) mostraron una cantidad significativamente elevada de *Mycoplasma* sp. en comparación con el grupo sano de control. Esto sugiere que los Micoplasmas pueden tener una función en el desarrollo de CCR.

15

Por tanto, el compuesto con capacidad de inhibir la adhesión celular de *Mycoplasma* sp. a la célula hospedadora es también de utilidad en el tratamiento y/o prevención del cáncer, en particular, cáncer de colon, gástrico, pulmón, próstata o renal.

20 Tal como se ha indicado anteriormente, en una realización en particular, el microorganismo micoplasma es *M. genitalium*. *M. genitalium* es responsable de diversas infecciones de transmisión sexual (ITS), tales como uretritis en hombres y cervicitis en mujeres. Por lo tanto, en una realización en particular, la invención hace referencia a un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una infección por *M. genitalium*
25 o una enfermedad asociada a una infección por *M. genitalium* en un sujeto, en donde la infección se selecciona de la lista que consiste en meningitis aséptica, neuropatía periférica, ataxia cerebelosa, insuficiencia renal, pancreatitis, pericarditis, miocarditis, anemia hemolítica, uretritis, cervicitis y enfermedad inflamatoria pélvica.

30 El término "paciente" o "sujeto", tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a cualquier animal, preferiblemente un mamífero e incluye, pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates, y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, o roedores como ratas y ratones. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano de cualquier edad o raza.

35 En una realización en particular, el sujeto es un mamífero, preferiblemente, un humano.

El compuesto de la invención de utilidad para el tratamiento y/o prevención de una infección por *Mycoplasma* sp. o una enfermedad asociada a una infección de *Mycoplasma* sp. en un sujeto, puede estar comprendido en una composición, particularmente, una composición farmacéutica, para ser administrada al sujeto que va a ser tratado. Por tanto, en una
5 realización en particular, el compuesto de la invención está comprendido en una composición, en particular, una composición farmacéutica.

La composición que comprende el compuesto de la invención, de aquí en adelante “composición de la invención”, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección
10 por *Mycoplasma* sp. o una enfermedad asociada a una infección de *Mycoplasma* sp. en un sujeto, puede comprender un vehículo.

Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión “composición farmacéutica” hace referencia a una formulación que ha sido adaptada para administrar una dosis
15 predeterminada del compuesto de la invención a una célula, un grupo de células, un órgano, un tejido o un sujeto.

La expresión “cantidad terapéuticamente efectiva”, tal como se utiliza en la presente patente, se entiende como una cantidad capaz de proporcionar un efecto terapéutico, y que puede
20 ser determinada por la persona experta en el arte mediante medios utilizados comúnmente. La cantidad del compuesto de la invención que puede ser incluido en las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención variarán dependiendo del sujeto y el modo particular de administración. La dosificación apropiada del principio o principios activos dentro de la composición farmacéutica dependerá del tipo de enfermedad que va a ser
25 tratada, la gravedad y el transcurso de la enfermedad, de si la composición se administra por razones preventivas o terapéuticas, una terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta a la composición, y del criterio del médico tratante. La cantidad del compuesto de la invención es adecuadamente administrada al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, un nivel de dosificación
30 apropiado será generalmente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg; más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 mg/kg, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 2,5 mg/kg, aún más preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg, que puede ser administrado en una única o
35 en múltiples dosis. Los compuestos pueden ser administrados en un régimen de 1 a diversas veces por día o por dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete días, preferiblemente una vez cada dos días. La composición farmacéutica puede ser administrada durante al menos

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 o más días, preferiblemente durante 14 días. La composición farmacéutica puede ser administrada preferiblemente una vez cada dos días durante 14 días.

5 La composición, o composición farmacéutica de la invención puede además contener uno o diversos excipientes farmacéuticamente aceptables. Por “excipiente farmacéuticamente aceptable” se entiende una sustancia terapéuticamente inactiva que se utiliza para incorporar el ingrediente activo y que es aceptable para el paciente desde un punto de vista farmacológico/toxicológico y para el químico farmacéutico que lo produce desde un punto de vista físico/químico con respecto a la composición, formulación, estabilidad, aceptación del paciente y biodisponibilidad. El excipiente o vehículo también incluye cualquier sustancia que sirva para mejorar la administración y la efectividad del principio activo dentro de la composición farmacéutica. Entre los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables se incluyen uno o más de entre agua, suero fisiológico, solución tampón de fosfatos, dextrosa, glicerol, etanol y similares, además de combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden además comprender menores cantidades de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil en almacenamiento o la efectividad de la proteína de fusión o de las composiciones que forman parte de las composiciones farmacéuticas. Los ejemplos de vehículos adecuados se conocen bien en la literatura. Son ejemplos de vehículos sin limitación, una serie de sacáridos tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, y maltitol; una serie de almidones tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz y almidón de patata; una serie de celulosas tales como celulosa, metilcelulosa, carboximetil celulosa sódica, y hidroxilpropilmetilcelulosa; y una serie de sustancias de relleno tales como gelatina y polivinilpirrolidona. En algunos casos, puede añadirse un desintegrante tal como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido algínico, o alginato de sodio.

30

El número y la naturaleza de los excipientes farmacéuticamente aceptables dependen de la forma de dosificación deseada. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos por los expertos en el arte. Dichas composiciones pueden ser preparadas mediante los métodos convencionales conocidos en el estado del arte.

35

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier tipo de vía adecuada, tal como por vía oral, nasal, ocular, tópica, intradérmica, intracraneal o vía intravenosa. La vía preferida de administración de dichas composiciones farmacéuticas es la vía oral, nasal, ocular, tópica, intracraneal o intradérmica.

5

La administración por "Vía oral" se entiende como la composición farmacéutica incorporada al organismo tras la deglución.

"Vía nasal" se entiende como la administración de la composición farmacéutica insuflada a través de la nariz. La administración por "vía ocular" se entiende como la administración tópica de la composición farmacéutica por instilación directamente en el ojo. La administración por "vía tópica" se entiende como la aplicación en el exterior del organismo tal como, sin limitación, la piel, cuero cabelludo y uñas; y también la aplicación en las mucosas tales como, sin limitación, mucosa bucal, nasal o rectal. La administración por "vía intradérmica" se entiende como la administración de la composición farmacéutica mediante inyección en la dermis. La "vía intracraneal" se entiende como la administración de la composición farmacéutica dentro del cráneo. La administración por "vía intravenosa" se entiende como la administración de la composición farmacéutica mediante inyección en el flujo sanguíneo.

20

La composición de la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una infección por *Mycoplasma* sp. o una enfermedad asociada a una infección de *Mycoplasma* sp. en un sujeto, puede comprender otros compuestos o moléculas útiles para el tratamiento y la prevención de una infección por *Mycoplasma* sp. o una enfermedad asociada a una infección de *Mycoplasma* sp. en un sujeto. Ejemplos de estos compuestos incluyen, sin limitarse a, eritromicina, azitromicina, claritromicina, tetraciclina, minociclina, clindamicina, ofloxacina, cloranfenicol, o cualquier antibiótico que se conozca que tenga actividad contra micoplasmas.

30 *Péptido de la invención*

En otro aspecto, la invención hace referencia a un péptido que comprende la secuencia Ser-Phe-Ser y/o la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2), de aquí en adelante "péptido de la invención". En otra realización más particular, el péptido consiste en la secuencia Ser-Phe-Ser y/o Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2). En otra realización en particular, el péptido de la invención no comprende la secuencia de longitud completa de la adhesina P110 de *M. genitalium* (SEQ ID NO: 1). El péptido de la invención imita el sitio de unión al receptor de la

adhesina P110 y compite con el sitio de unión al receptor natural de *Mycoplasma* sp. para el receptor de la célula hospedadora, es decir, los oligosacáridos sialilados. A continuación, bajo el encabezado "péptido de la invención", se proporciona una descripción detallada del péptido de la invención.

5

El término "péptido" o "polipéptido", tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia en general a una cadena lineal de aproximadamente 2 a 100 residuos de aminoácidos unidos entre sí con enlaces peptídicos. Se entenderá que los términos "enlace peptídico", "péptido", "polipéptido" y proteína son conocidos para el experto en el arte. De aquí en adelante, "péptido" y "polipéptido" serán utilizados indistintamente. Tal como se utiliza en la presente patente, un "residuo de aminoácido" hace referencia a cualquier aminoácido de origen natural, cualquier aminoácido derivado o cualquier imitador de aminoácido conocido en el arte. El término "residuo de aminoácido" abarca tanto los residuos de L- como de D-aminoácidos. El péptido comprende al menos un D-aminoácido.

10

15

El término "D-aminoácido", tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia al enantiómero D de un aminoácido, que es la imagen especular del L-aminoácido. En una realización en particular, el péptido de la invención comprende 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más D-aminoácidos. En una realización en particular, el péptido consiste en menos de 90, menos de 80, menos de 70, menos de 60, menos de 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20 o menos de 10 residuos de aminoácidos. En una realización en particular, el péptido de la invención es de entre 3 y 50 aminoácidos de longitud, preferiblemente entre 3 y 40, más preferiblemente entre 3 y 30, incluso más preferiblemente entre 3 y 20. En una realización en particular, el péptido es de entre 3 y 15 aminoácidos de longitud. En otra realización en particular, el péptido es de entre 4 y 8 aminoácidos de longitud.

20

25

En una realización en particular, el péptido de la invención puede comprender la secuencia Ser-Phe-Ser y la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2), donde cada secuencia actúa como un dominio. En una realización más en particular, ambas secuencias pueden conectarse mediante un conector peptídico o espaciador que comprende "n" aminoácidos, donde "n" es un número entero entre 0 y 50, preferiblemente, "n" es un número entero entre 3 y 47 aminoácidos. El conector peptídico permite que la estructura asuma una conformación específica. El conector comprende varios aminoácidos enlazados con péptidos que definen un polipéptido de una longitud suficiente para abarcar la distancia entre el extremo C terminal de uno de los dominios y el extremo N terminal del otro. El conector puede comprender aminoácidos hidrófilos que juntos preferiblemente constituyen una secuencia hidrófila. Los conectores que asumen una configuración polipeptídica no

30

35

estructurada en una solución acuosa funcionan bien. El conector puede además incluir uno o dos sitios de corte integrados, es decir, un aminoácido o una secuencia de aminoácidos susceptible de ataque por un agente de corte específico del sitio. Esta estrategia permite que los dominios se separen después de la expresión. Los aminoácidos del conector se
5 seleccionan preferiblemente de entre aquellos que tienen cadenas laterales relativamente pequeñas y no reactivas. Se prefieren la alanina, serina y la glicina.

En otra realización en particular, el péptido comprende la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2) y/o la secuencia Gly-Ser-Phe-Ser-Ile (SEQ ID NO: 3). En otra realización más en
10 particular, el péptido consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3.

El péptido de la invención puede ser obtenido por cualquier método conocido en el arte, por ejemplo, pero no limitado a, *in vitro* como por ejemplo por síntesis química o mediante técnicas de proteínas recombinantes. Por ejemplo, a través de síntesis de péptidos en fase
15 sólida o mediante aproximaciones de ADN recombinante. Los péptidos de la invención pueden ser producidos de forma recombinante, no solo directamente sino también como péptidos y polipéptidos de fusión junto con uno o más péptidos heterólogos o polipéptidos que pueden contener, por ejemplo, pero sin limitarse a, una secuencia señal, una secuencia marcadora u otro péptido que tenga un sitio de corte de la proteasa, por ejemplo, pero sin
20 limitarse a, en el extremo N-terminal del péptido o polipéptido maduro. Los péptidos de la invención pueden también comprender uno o más grupos químicos enlazados a los extremos N-terminal y/o C-terminal, tales como grupos biotina o grupos fluorescentes que permiten la visualización y monitorización del péptido o polipéptido. La producción recombinante de los péptidos de la invención comprende el diseño, y opcionalmente la
25 amplificación, de un polinucleótido que codifica dicho péptido, la clonación del polinucleótido en un constructo génico, preferiblemente en un vector de expresión, la transformación o transfección de una célula competente con dicho constructo, el cultivo de dicha célula bajo condiciones que promueven la expresión del péptido de la invención y el aislamiento y purificación del péptido de la invención producido o expresado por la célula.

30 La presente invención también abarca proteínas de fusión que comprenden el péptido de la invención. Por tanto, en otro aspecto, la invención hace referencia a una proteína de fusión, de aquí en adelante "proteína de fusión de la invención", que comprende el péptido de la invención y al menos un polipéptido heterólogo. El péptido de la invención ha sido definido
35 previamente. Todas las realizaciones particulares y preferidas del péptido de la invención se pueden aplicar completamente a la proteína de fusión de la invención.

El término “proteína de fusión”, tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a una única cadena polipeptídica diseñada artificialmente, que comprende dos o más secuencias de diferentes orígenes, natural y/o artificial. La proteína de fusión, por definición, no se encuentra nunca en la naturaleza como tal. El término “polipéptido heterólogo”, tal como se utiliza en la presente patente, significa que el polipéptido no se encuentra de forma natural fusionado al péptido de la invención. En una realización en particular, el polipéptido heterólogo es un péptido que es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica. La conjugación del péptido de la invención a este tipo de péptido facilitará que el péptido cruce la barrera hematoencefálica y es especialmente útil para administrar el péptido en el sistema nervioso central mediante una administración sistémica. Los péptidos capaces de cruzar la barrera hematoencefálica son conocidos en el arte y cualquiera de ellos puede utilizarse en la presente invención.

La proteína de fusión de la invención puede ser obtenida mediante una técnica adecuada que permita obtener dos péptidos (el péptido de la invención y el polipéptido heterólogo) en una única cadena de polinucleótidos. Dichas técnicas incluyen técnicas recombinantes, donde un constructo génico que codifica la proteína de fusión se introduce en un vector adecuado para la expresión en un sistema de expresión adecuado, y técnicas de ligamiento que implican la formación de un enlace peptídico entre dos polipéptidos, como el ligamiento químico nativo o el ligamiento de proteínas expresadas.

En otro aspecto, la invención hace referencia a una nanopartícula, de aquí en adelante “nanopartícula de la invención”, que comprende el péptido o la proteína de fusión de la invención. El péptido y la proteína de fusión han sido definidos previamente. Todas las realizaciones del péptido y de la proteína de fusión de la invención son completamente aplicables a la nanopartícula de la invención.

El término “nanopartícula”, tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a cualquier material que tenga dimensiones en el rango de 1-1.000 nm. En algunas realizaciones, las nanopartículas tienen dimensiones en el rango de 2-200 nm, preferiblemente en el rango de 2-150 nm, e incluso más preferiblemente en el rango de 2-100 nm. Las nanopartículas pueden contribuir a preservar la integridad del péptido o de la proteína de fusión en los fluidos biológicos hasta que alcanza el órgano diana. Más aún, en el caso de una fusión que comprende un inmunomodulador, la encapsulación de la composición puede disminuir los efectos secundarios causados por el modulador. Por

último, las nanopartículas pueden también modificarse para incluir fracciones que permitan dirigir la nanopartícula a un órgano de interés. Las nanopartículas adecuadas que pueden ser utilizadas en el contexto de la presente invención incluyen materiales de nanoescala tales como nanopartículas basadas en lípidos (tales como liposomas), una nanopartícula supermagnética, una nanoesfera, un nanocristal semiconductor, un punto cuántico, nanopartícula a base de polímeros, nanopartícula a base de silicio, nanopartícula a base de sílice, una nanopartícula a base de metal, un fullereno y un nanotubo.

La administración dirigida puede lograrse mediante la adición de ligandos sin comprometer la habilidad de las nanopartículas para administrar sus cargas útiles peptídicas. Se contempla que esto permitirá la administración a células, tejidos y órganos específicos. La especificidad dirigida de los sistemas de administración basados en ligandos, está basada en la distribución de los receptores de ligandos en diferentes tipos de células. El ligando dirigido puede estar asociado de forma no covalente o covalentemente con una nanopartícula, y puede conjugarse a las nanopartículas mediante una variedad de métodos tal como se ha discutido en la presente memoria. Entre los ejemplos de proteínas o péptidos que pueden ser utilizados para establecer como diana a nanopartículas se incluyen la transferina, lactoferrina, TGF- β , factor de crecimiento del sistema nervioso, albumina, péptido de VIH Tat, péptido RGD, e insulina, además de otros. Se entenderá que la formulación del producto de la invención en una nanopartícula no está destinada o no está únicamente destinada a facilitar el acceso del producto al interior de la célula, sino a proteger el producto de la degradación y/o para facilitar el direccionamiento de la nanopartícula al órgano de interés.

En otro aspecto, la invención hace referencia a una partícula similar a virus (VLP, por sus siglas en inglés), de aquí en adelante “partícula similar a virus de la invención”, que comprende el péptido o la proteína de fusión de la invención. El péptido y la proteína de fusión de la invención han sido descritos previamente. Todas las realizaciones particulares y preferidas del péptido y la proteína de fusión de la invención son completamente aplicables a la partícula similar a virus de la invención. El término “partícula similar a virus”, también denominado “VLP”, hace referencia a partículas no infecciosas que se parecen a virus que no contienen ningún material genético vírico. La VLP son el resultado de la expresión de proteínas estructurales víricas, tales como proteínas de la cápside, y su auto-ensamblaje. En una realización en particular, la VLP puede comprender, o alternativamente consistir en, proteínas estructurales de Parvovirus, Rotavirus; proteínas estructurales de virus tipo Norwalk; proteínas estructurales de Alfavirus; proteínas estructurales de virus de la fiebre

aftosa; proteínas estructurales de virus del sarampión, proteínas estructurales Sindbis, proteínas estructurales de Retrovirus, proteínas estructurales del virus de la Hepatitis B (por ejemplo, HBcAg); proteínas estructurales de virus del mosaico del tabaco; proteínas estructurales del virus “*Flock House*”; proteínas estructurales del virus del papiloma humano; 5 proteínas estructurales de Polyoma virus; proteínas estructurales de bacteriófagos, proteínas estructurales de fagos de ARN. En una realización en particular, el péptido o proteína de fusión de la invención está acoplada o unida a la cápside de la partícula similar a virus. La unión del péptido o proteína de fusión a la cápside puede ser un enlace covalente o no covalente.

10

La presente invención también abarca el ácido nucleico que codifica el péptido, el péptido de fusión o el anticuerpo de la invención como ha sido divulgada previamente a lo largo de la presente descripción. En la presente invención, los términos “ácido nucleico” y “secuencia de nucleótidos” son equivalentes y pueden ser utilizados de forma intercambiable a lo largo 15 de la presente descripción.

Por tanto, en otro aspecto, la invención hace referencia a un ácido nucleico (o secuencia de nucleótidos) que codifica el péptido, la proteína de fusión o el anticuerpo de la invención, de aquí en adelante “ácido nucleico de la invención”, y a un constructo génico que comprende 20 dicho ácido nucleico, de aquí en adelante “constructo génico de la invención”. Los términos péptido, proteína de fusión y anticuerpo de la invención han sido definidos previamente. Todas las realizaciones particulares y preferidas del péptido, la proteína de fusión y el anticuerpo de la invención son completamente aplicables al ácido nucleico y al constructo génico de la invención.

25

Los términos “polinucleótido”, “ácido nucleico” y “molécula de ácido nucleico” se utilizan de forma intercambiable para hacer referencia a unas formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud. Los polinucleótidos pueden contener desoxirribunucleótidos, ribonucleótidos, y/o sus análogos. Los nucleótidos pueden tener cualquier estructura 30 tridimensional, y puede realizar cualquier función, conocida o desconocida. El término “polinucleótido” incluye, por ejemplo, moléculas de cadena única, de doble cadena y de triple hélice, un gen o fragmento del gen, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido 35 nucleico, y cebadores. Además de una molécula de ácido nucleico nativa, una molécula de ácido nucleico de la presente invención puede también comprender moléculas de ácido

nucleico modificadas. Tal como se utiliza en la presente patente, ARNm hace referencia a un ARN que puede ser traducido en una célula.

5 En una realización preferida, el polinucleótido de la invención es un ARNm. El ARNm puede ser sintetizado químicamente, puede obtenerse mediante transcripción in vitro o puede ser sintetizado in vivo en la célula diana. Las secuencias de nucleótidos que forman el ácido nucleico que codifica el conjugado o la proteína de fusión de la invención se encuentran en el mismo marco de lectura correcto para la expresión de las mismas.

10 Las secuencias de ácido nucleico de la invención pueden codificar los péptidos maduros o los polipéptidos o pre-proteínas, que consisten en un péptido señal ligado al péptido maduro o polipéptido que debe ser procesado posteriormente. Las secuencias de nucleótidos de la presente invención pueden también comprender, además de la secuencia de codificación, otros elementos, tales como intrones, secuencias de no codificación en los extremos 3' y/o
15 5', sitios de unión a ribosomas, sitios de restricción, etc. Estas secuencias de nucleótidos pueden además incluir secuencias de codificación de aminoácidos adicionales que son útiles para la purificación o estabilidad de los péptidos o polipéptidos codificados.

El término "constructo génico" tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia al
20 ácido nucleico de la invención junto con regiones adecuadas para regular la expresión de dicho ácido nucleico, incluyendo promotores, terminadores de la transcripción, regiones 5' y 3' no terminadas, señales de poliadenilación y similares. La expresión "constructo génico", "constructo genético" o "constructo de ácido nucleico", tal como se utilizan en la presente patente hace referencia a una unidad funcional requerida para transferir, y preferiblemente
25 para expresar, una secuencia de ácido nucleico de interés, en la presente memoria las secuencias de nucleótidos de la invención según se han descrito, en una célula hospedadora. Estos constructos preferiblemente también comprenden secuencias de regulación o control que incluyen, por ejemplo, un promotor, un potenciador, un terminador, etc. ligados de forma funcional a la secuencia que codifica el péptido o polipéptido. Estos
30 constructos génicos hacen referencia a una molécula de ácido nucleico, mono o bicatenaria, que se aísla de un gen natural o que se modifica para contener segmentos de ácido nucleico de tal manera que podrían no existir de otro modo en la naturaleza. La expresión "constructo de ácido nucleico" es sinónima de la expresión "casete de expresión", cuando el constructo de ácido nucleico contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de la
35 secuencia de codificación. Preferiblemente, los constructos génicos de la invención comprenden además un promotor ligado de forma funcional a las secuencias de ácido

nucleico de la invención. El promotor puede ser, pero sin limitaciones, un promotor constitutivo o inducible. Preferiblemente, los constructos génicos de la invención comprenden además un terminador.

5 En otro aspecto, la invención hace referencia a un vector, de aquí en adelante “vector de la invención”, que comprende el ácido nucleico de la invención. El término “vector”, tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a una secuencia de ácido nucleico que comprende las secuencias necesarias para que después de transcribir y traducir dichas secuencias en una célula, se genere un polipéptido codificado por el ácido nucleico de la
10 invención. Dicha secuencia se encuentra ligada de forma funcional a segmentos adicionales que proveen su replicación autónoma en una célula hospedadora de interés. Preferiblemente, el vector es un vector de expresión, que se define como un vector que, además de las regiones de la replicación autónoma en una célula hospedadora, contiene regiones ligadas de forma funcional al ácido nucleico de la invención y que son capaces de
15 aumentar la expresión de los productos del ácido nucleico de acuerdo con la invención. Los vectores de la invención pueden ser obtenidos mediante técnicas ampliamente conocidas en el arte. Entre los ejemplos de vectores se incluyen, pero sin limitarse a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, plásmidos, cósmidos o vectores de fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos,
20 vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas, y ciertas células eucariotas, tales como células productoras.

El vector de la invención puede ser utilizado para transformar, transfectar o infectar células que pueden ser transformadas, transfectadas o infectadas por dicho vector. Dichas células
25 pueden ser procariotas o eucariotas.

El vector preferiblemente comprende el ácido nucleico de la invención enlazado operacionalmente a secuencias que regulan la expresión del ácido nucleico de la invención. Las secuencias reguladoras de uso en la presente invención pueden ser promotores
30 nucleares o, de forma alternativa, secuencias potenciadoras y/o otras secuencias reguladoras que aumentan la expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. En principio, cualquier promotor puede ser utilizado en la presente invención siempre que dicho promotor sea compatible con las células en donde el ácido nucleico va a ser expresado.

35 El vector de expresión de la invención se introduce en una célula hospedadora de tal manera que el vector permanece como un constituyente cromosómico o como un vector

auto-replicante extracromosómico. Ejemplos de vectores de expresión son, pero sin limitaciones, fagos, cósmidos, fagémidos, cromosomas artificiales de levadura (YAC, por sus siglas en inglés), cromosomas artificiales bacterianas (BAC, por sus siglas en inglés), cromosomas artificiales humanos (HAC, por sus siglas en inglés) o vectores virales, tales como adenovirus, retrovirus o lentivirus. Ejemplos de vectores de expresión apropiados para la introducción de polinucleótidos de la invención son, preferiblemente pero sin limitaciones, pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, plásmidos mp18, mp19, pBR322, pMB9, Co1E1, pCR1, RP4, pET, fagos y vectores “lanzadores”, tales como pSA3 y pAT28; vectores de expresión de levadura tal como el plásmido de 2-micras de *Saccharomyces cerevisiae*, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centrómeros y similares; vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y pVL; vectores de expresión en células vegetales tales como piBi, pEarleyGate, PAVA, pCAMBIA, PGSA, PGWB, PMDC, PMY, series de poros y similares, y otros plásmidos de expresión de proteínas utilizados en células eucariotas, incluyendo baculovirus adecuados para la transfección celular.

Además, los constructos génicos de la invención preferiblemente comprenden un marcador, tal como un gen resistente a la ampicilina. Dichos plásmidos se encuentran disponibles comercialmente (serie pUC (Takara S buzo), serie pPROK (Clontech), pKK233-2 (Clontech), etc.). De forma alternativa, el marcador puede ser otro gen resistente a fármacos tales como un gen resistente a kanamicina, neomicina o cloranfenicol, o un gen de fluorescencia, tal como luciferasa, GFP, mCherry, y similares. O bien el marcador puede ser un marcador genético auxotrófico.

En otro aspecto de la invención, esta hace referencia a una célula aislada, preferiblemente una célula eucariota, más preferiblemente una célula de mamífero, incluso más preferiblemente una célula humana, de aquí en adelante “célula de la invención”, que comprende el péptido, la proteína de fusión, anticuerpo, ácido nucleico, constructo génico o vector de la invención. El término “aislado” significa que el elemento ha sido separado y extraído de su entorno natural o sintetizado in vitro y que se encuentra fuera de un organismo vivo (ex vivo).

El péptido, la proteína de fusión, anticuerpo, ácido nucleico, constructo génico y vector de la invención ha sido definido previamente. Todas las realizaciones particulares y preferidas del péptido, la proteína de fusión, anticuerpo, ácido nucleico, constructo génico y vector de la invención son completamente aplicables a la célula de la invención. Las células adecuadas

en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células de mamíferos, levaduras, plantas, insectos, células fúngicas y bacterianas.

5 En otro aspecto, la presente invención hace referencia a un anticuerpo, tal como se ha denominado anteriormente en la presente descripción “anticuerpo de la invención”, que se une específicamente al péptido de la invención. Todas las características y realizaciones particulares del anticuerpo de la invención han sido explicadas anteriormente en párrafos previos.

10 En otro aspecto, la presente invención hace referencia a una composición que comprende el péptido de la invención (que ha sido explicado en detalle en párrafos previos), el ácido nucleico, el vector, la célula o el anticuerpo de la invención. Todas las características y realizaciones particulares divulgadas en párrafos previos en referencia a la composición de la invención son aplicables al presente aspecto inventivo.

15 En otro aspecto, la presente invención hace referencia a la secuencia de nucleótidos, el vector, la célula y/o el anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección por *Mycoplasma* sp. o una enfermedad asociada a una infección por *Mycoplasma* sp. en un sujeto. Todas las características y realizaciones en particular de la secuencia de nucleótidos, el vector, la célula y/o el anticuerpo de la invención han sido explicadas anteriormente en párrafos previos.

Método de cribado de la invención

25 En otro aspecto de la invención, el péptido de la invención, o el sitio de unión al receptor de la adhesina P110 de *M. genitalium*, se utiliza en un método de cribado de compuestos con capacidad para inhibir la adhesión celular de *Mycoplasma* sp. a la célula hospedadora para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una infección por *Mycoplasma* sp. o una enfermedad asociada a una infección por *Mycoplasma* sp. en un sujeto.

30 Por lo tanto, en otro aspecto, la invención hace referencia a un método de cribado *in vitro*, de aquí en adelante “el método de cribado de la invención”, para el cribado de compuestos útiles para el tratamiento y/o la prevención de una infección por *Mycoplasma* sp. o una enfermedad asociada a una infección por *Mycoplasma* sp. en un sujeto, que comprende

35 a) poner el compuesto que va a ser sometido a ensayo en contacto con el sitio de unión al receptor de la adhesina P110 de *M. genitalium*, o con el péptido de la invención, y

b) analizar la unión entre el compuesto y el sitio de unión al receptor o el péptido del paso a),

en donde el compuesto sometido a ensayo es de utilidad para el tratamiento y la prevención de una infección por *Mycoplasma* sp. o una enfermedad asociada a una infección por *Mycoplasma* sp. cuando se detecta una unión en el paso b).

En una primera etapa, el método de cribado de la invención comprende poner el compuesto que va a ser sometido a ensayo en contacto con el sitio de unión al receptor de la adhesina P110 de *M. genitalium*, o con el péptido de la invención. Este paso puede ser realizado incubando el compuesto que va a ser sometido a ensayo con el sitio de unión al receptor de la adhesina P110 de *M. genitalium*, o con el péptido de la invención bajo las condiciones apropiadas para permitir la unión del compuesto a la diana, donde dicho sitio de unión al receptor o péptido de la invención es la diana.

En una realización en particular del método de cribado de la invención, el sitio de unión al receptor de la adhesina P110 de *M. genitalium* comprende la secuencia Ser-Phe-Ser y/o la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2).

En otra realización en particular, el péptido de la invención comprende la secuencia Ser-Phe-Ser y/o la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2) que, en una realización más en particular, comprende las secuencias SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3. En particular, el péptido de la invención no comprende las secuencias SEQ ID NO: 1. Se han divulgado las definiciones y la descripción detallada del péptido de la invención y sus realizaciones particulares en párrafos previos.

El compuesto que va a ser sometido a ensayo puede ser un compuesto análogo a los oligosacáridos del receptor de la célula hospedadora. El término "oligosacárido sialilado" se ha definido anteriormente. Entre los ejemplos de compuestos que van a ser sometidos a ensayo se incluyen, pero sin limitarse a ellos, polímeros dendríticos conjugados con ácido siálico no tóxicos y derivados del ácido siálico con enlace covalente que incluyen grupos fenil- o metil- umbeliferilo, entre otros.

Si el compuesto que va a ser sometido a ensayo es un anticuerpo o un fragmento del mismo, la incubación se realiza bajo condiciones que permiten la formación y monitorización de complejos antígeno-anticuerpo. Para hacer esto, la diana y/o el compuesto que va a ser

sometido a ensayo es marcado, más preferiblemente con un marcador bioluminiscente o fluorescente.

5 El término “unión” hace referencia a una unión física total o parcial o a una unión que ejerce un impedimento estérico. El término “interferencia” hace referencia a la capacidad del compuesto para bloquear o inhibir totalmente o parcialmente la actividad de la diana, es decir, la adhesión celular de *Mycoplasma* sp al receptor de la célula hospedadora mediante el bloqueo de la interacción entre el receptor de la célula hospedadora (los oligosacáridos del ácido siálico) y el sitio de unión al receptor de la adhesina P110 de *M. genitalium*.

10

En una segunda etapa, el método de cribado de la invención comprende analizar la unión entre el compuesto y el sitio de unión al receptor de la adhesina P110 de *M. genitalium* o el péptido de la invención. Dependiendo de la naturaleza del compuesto que va a ser sometido a prueba, el análisis de la unión o interferencia en el paso (b) puede realizarse, por ejemplo, pero sin limitaciones, mediante análisis FRET (Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia), BRET (Transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia), por microscopía TIRF (Microscopía de Fluorescencia de Reflexión Interna Total), microscopía STED (Agotamiento de emisión estimulada) de alta resolución, Biacore (SPR, Resonancia del plasmón superficial), Citometría de flujo, análisis Western blot, geles de electroforesis, 15 inmunoprecipitación, matrices de proteínas, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, ELISA o cualquier otro método enzimático; mediante incubación utilizando un ligando específico, preferiblemente CXCL12; mediante IRM o cualquier otra técnica de toma de imágenes; o, por ejemplo, utilizando técnicas cromatográficas combinadas con espectrometría de masas.

25

Una vez que se detecta la unión, el compuesto sometido a ensayo se considera de utilidad para el tratamiento y/o la prevención de una infección por *Mycoplasma* sp. o una enfermedad asociada a una infección por *Mycoplasma* sp. en un sujeto. Pueden encontrarse definiciones de estas enfermedades y ejemplos de las mismas anteriormente en referencia a 30 los usos médicos de la invención.

En otro aspecto, la presente invención hace referencia a un compuesto obtenido por el método de cribado de la invención.

35 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos tienen el mismo significado que el que es entendido comúnmente por un experto en el arte al que

esta invención pertenece. Pueden utilizarse, en la práctica de la presente invención, métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente patente. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprender” y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes, o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales resultarán evidentes para los expertos en el arte tras el examen de la descripción, o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Representación esquemática de la predicción del dominio proteico de la P110 por el servidor Psi-Pred (Jones, D.T. 1999. J Mol Biol, 292: 195-202) y el constructo proteico (erP110) diseñado para este estudio.

15

Figura 2. Estructura global de la P110. A) Dos vistas, separadas noventa grados entre sí, de la región extracelular de P110 que está formada por un dominio N grande, con una topología de hélice de tipo barril β de siete hojas (Blades) (verde) y la corona (marrón), y el dominio C (naranja). En el panel lateral derecho la vista transcurre a lo largo del eje central de la hélice de tipo barril β . La situación de las siete hojas en la hélice se indica explícitamente, mostrando que las dos hojas terminales I y VII se encuentran cerca del dominio C-terminal y opuestas a la corona.

20

Figura 3. Vista estereoscópica de la superposición de tipo hélice β de erP110 sobre la hélice de tipo barril β (β -barrel propeller) habitual de Virginiamicina B Liasa (una enzima de degradación de antibióticos; código de acceso del PDB 2Z2N), con un r.m.s.d. de 3,6 Å. Se obtuvo la relación estructural por el servicio de red de Dali Server.

25

Figura 4. Unión de oligosacáridos de ácido siálico a la P110. A) Representación esquemática de la disposición de la P110 con respecto a la membrana de micoplasmas (mismo código de color que en la Figura 1). La hélice transmembrana que se predice sigue en secuencia al dominio C, que por consiguiente se espera que esté cerca de la membrana celular. La estructura global de la P110 puede ser representada como una letra **P** mayúscula con el sitio de unión al ácido siálico (indicado en la figura con un rectángulo) situado en la corona, lejos de la membrana celular. Detalle de la unión a la P110 de los oligosacáridos del ácido siálico (B) 3SL y (C) 6SL. Los paneles izquierdos muestran la densidad de electrones

35

correspondientes a oligosacáridos en un mapa de omisión de sigma ponderado (Fo-Fc) a un sigma 2. El sitio de unión y las interacciones de unión con la P110 para ambos oligosacáridos son muy similares, pero no idénticos.

5 **Figura 5. Comparación de los sitios de unión siálica en adhesinas bacterianas.** La unión de la fracción de ácido neuramínico de oligosacáridos a (A) adhesina P110 de *M. genitalium* y a las adhesinas de repetición rica en serina (SRR) de (B) SrpA (*Streptococcus sanguinis*, código de acceso 5IJ1 del Protein Data Base (PDB)) y (C) GspB (*Streptococcus gordonii*, código de acceso 5IUC del PDB). El tripéptido extendido X-Tyr/Phe-Ser/Thr
10 (residuos 456-458 en P110) parece ser un motivo de unión común para el ácido siálico. Los átomos de carbono para los oligosacáridos se representan en color azul claro, mientras que los residuos de proteínas se representan en color marrón. Los átomos de nitrógeno y oxígeno se representan en color azul oscuro y rojo, respectivamente.

15 **Figura 6. Análisis de afinidad de oligosacáridos 3SL y 6SL con erP110 y caracterización de cepas de *M. genitalium* que portan mutaciones diana en la P110.** A) Sensogramas SPR que muestran la unión del dominio N de hélice β de erP110 a 3SL y 6SL inmovilizados (paneles superior e inferior, respectivamente). Ajuste de datos de los duplicados asumiendo un modelo de afinidad de Langmuir a una relación 1:1 que representa
20 la K_D calculada en estado estable para 3SL y 6SL (paneles derechos superior e inferior, respectivamente). B) SDS-PAGE de lisados celulares completos de WT diferentes cepas mutantes de P110. C) Ensayos de hemadsorción determinada por análisis FACS. La gráfica representa gráficos de la inversa de Langmuir con una cantidad fija de células de micoplasmas y cantidades crecientes de glóbulos rojos. Los gráficos fueron generados
25 utilizando datos de, al menos, dos repeticiones biológicas para cada cepa.

Figura 7. Sitio de inserción del mini-transposón TnPacP110 dentro del cromosoma de los mutantes en particular seleccionados para el análisis de citoadherencia. Los triángulos de color negro indican el sitio de inserción y la orientación de los diferentes mini-transposones
30 TnPacP110 dentro del marcador tetM.

Figura 8. Unión del potasio a la P110. A) Vistas generales del sitio de unión del potasio (indicado por un rectángulo) en el dominio C-terminal de erP110. El detalle del sitio de unión al potasio en presencia (B) y en ausencia (C) de potasio. La densidad de electrones correspondiente al potasio se muestra con un mapa de omisión de sigma ponderado (Fo-Fc)
35 a un sigma 4.

Figura 9. Regiones MgPar de P110. A) Alineamiento de secuencias de la región variable KL de la P110 y diferentes MgPars que abarcan el sitio de unión al ácido siálico. La región KL de MgPar-3 porta diversos codones de terminación dentro del segmento alineado y no se incluyó en el análisis. De igual manera, la región MgPar-6 fue omitida porque no contiene secuencias variables homólogas a P110. Se mostró que los residuos son de vital importancia para la adhesión celular en este trabajo (estrella de color negro) parecen estar completamente conservados en la región variable KL de todas las repeticiones MgPar. Estos residuos también se conservan en la proteína *M. pneumonia* MP_142, ortóloga a la P110 (parte inferior del panel). (B) Dos vistas, separadas noventa grados entre sí, de la superficie de P110. Se representan las regiones variables KL (residuos 42 a 294 en rojo) y LM (residuos 462 a 517 en azul) y la sección de poli-Serina (409 a 419 en amarillo) de la proteína P110. Las regiones variables rodean el sitio de unión al receptor donde se muestra un oligosacárido enlazado (verde). MG_192: SEQ ID NO: 25; MgPAR-1: SEQ ID NO: 26; MgPAR-2: SEQ ID NO: 27; MgPAR-4: SEQ ID NO: 28, MgPAR-5: SEQ ID NO: 29, MgPAR-7: SEQ ID NO: 30; MgPAR-8: SEQ ID NO: 31; MgPAR-9: SEQ ID NO: 32; MPN_142: SEQ ID NO: 33.

EJEMPLOS

20

I. MATERIAL Y MÉTODOS

Clonación, expresión y purificación de P110

La región correspondiente al gen MG_192 de *M. genitalium* (cepa G37, residuos 23-938, código de acceso M31431.1 del GenBank) fue amplificado a partir de un clon de ADNc (Genscript) utilizando los cebadores P110F y P110R como Directo e Inverso respectivamente. Los fragmentos de PCR fueron clonados en el vector de expresión pOPINE (donación de Ray Owens Addgene plásmido #26043) para generar una proteína marcada con Histidina C-terminal. La proteína recombinante fue obtenida después de la expresión en células B834 BL21 en 20°C O/N inducido con 1 mM IPTG a 0,6 OD₆₀₀. Las células fueron cultivadas y lisadas en un tampón 1xPBS mediante sonicación. Posteriormente, el extracto celular se centrifugó a 20 krpm y a una temperatura de 4°C, y se aplicó el sobrenadante a una columna Histrap de 5mL (GE Healthcare) equilibrada con 1xPBS como tampón de unión y 1xPBS, 500mM de Imidazol como tampón de elución. Alícuotas solubles de P110 marcada con His₆ se agruparon y se cargaron en un aparato HiLoad Superdex 200 16/60 (GE Healthcare) en un tampón que consistía en 50mM Tris pH

35

7,4 y 150 mM de NaCl. Se produjo P110 marcada con SeMet con medios SeMet™ (Molecular dimensions™) y siguiendo el protocolo incluido en el Kit MD12-500. La purificación de la proteína marcada con SeMet se sometió al mismo protocolo descrito para la proteína P110 nativa.

5

Cristalización y preparación de complejos con oligosacáridos 3SL y 6SL

Se realizó un cribado para las condiciones de cristalización iniciales con 150 nL de gotas de placas de 96 pocillos en un robot de coordenadas cartesianas. Se prepararon cristales de proteína recombinante P110 marcada con SeMet mezclando 1 μ L+1 μ L de proteína P110 (13,2 mg/ml) y una solución de reservorio que contiene PEG 8000 al 11%, 0,1 M Imidazol con pH8, 0,2 M Acetato de calcio a una temperatura de 20°C. Para obtener tanto el complejo 3SL como el 6SL, la P110 nativa fue incubada con 10 mM de cada oligosacárido durante 30 minutos a 20°C antes de mezclarla con una solución de reservorio que contiene PEG 3350 al 21%, 0,2 M Citrato de Tri-Potasio. Todos los cristales fueron ultracongelados en nitrógeno líquido con glicerol al 20% como crioprotector.

15

Recogida de datos de rayos X y determinación de la estructura

Se realizaron experimentos de difracción de rayos X en la línea de luz Xaloc (ALBA, España) para nativos marcados con SeMet y cristales de 3SL. Se midieron los experimentos de difracción de cristales 6SL en la línea de luz ID23-1 (ESRF, Grenoble). Los datos de dispersión anómala simple (SAD, por sus siglas en inglés) del cristal de SeMet se recogieron en el límite de energía del Selenio-k. Los datos se procesaron con Xia2 (Winter, G. 2010. *Journal of Applied Crystallography*, 43: 186-190) utilizando XDS (Kabsch, W. 2010. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66: 125-32), Aimless y Pointless (Evans, P. 2006. *Acta Crystallographica Section D*, 62: 72-82) de la suite de programas CCP4i (CCP4. CCP4 suite: programas para cristalografía de proteínas. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 50, 760-3 (1994). El cristal de SeMet pertenece al grupo espacial I222 con $a=109.93$ Å, $b=152.91$ Å, $c=174.69$ Å y un monómero en la unidad asimétrica. Las posiciones de todos los seis átomos de Se esperados fueron localizadas con ShelxC/D y escaladas a 2,95 Å con ShelxE (Sheldrick, G.M. 2008. *Acta Crystallogr A*, 64: 112-22). Las fases iniciales fueron mejoradas con 10 ciclos de modificación de la densidad con RESOLVE (Erwilliger, T. 2001. *Acta Crystallographica Section D* 57: 1755-1762) y las fases se extendieron para datos de un cristal nativo hasta 2,73 Å. Los datos de 3SL y 6SL fueron resueltos mediante el método de Reemplazo Molecular con coordenadas nativas como el modelo inicial para determinar las orientaciones y posiciones de un monómero tanto en 3SL como en 6SL en la unidad asimétrica mediante Phaser (McCoy, A.J. 2007. *Acta Crystallographica Section D: Biological*

30

35

Crystallography, 63, 32-41). Los modelos finales nativo, 3SL y 6SL fueron trazados y refinados con Coot (Emsley, P. & Cowtan, K. 2004. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60: 2126-32) y Refmac5 (Murshudov, G.N. et al. 2011. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67: 355-367), respectivamente.

5

Resonancia de plasmón superficial

La cinética de la unión fue determinada por resonancia de plasmón superficial utilizando una plataforma de biosensor Biacore 3000 (GE Biosystems) equipada con un chip biosensor S1 recubierto con estreptavidina de grado adecuado para investigación. El chip se ancló al
10 instrumento y se pre-acondicionó con tres inyecciones de 1 min de de NaCl 1 M en NaOH 50 mM. Tanto el oligosacárido de 3SL-biotina como el de 6SL-biotina (Dextra) fueron inyectados en la segunda y tercera celda de flujo respectivamente a 10µg/ml diluidos en HBS-P (Hepes10mM, pH 7,4, NaCl 0,15M y P20 al 0,005%). La primera celda se dejó en blanco para ser utilizada como referencia. El tampón en curso consistió en HBS-P a un
15 caudal/tasa de flujo de 30 µl/min y los niveles de inmovilización adquiridos fueron ~150 y ~175 unidades de respuesta para 3SL-biotina y 6SL-biotina respectivamente.

Una serie de la proteína erP110 purificada diluida en HBS-P (0,3 µM, 0,6 µM, 1,2 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM) fue inyectada en la superficie de la celda de flujo a 30 µl/min. El análisis
20 de interacción se realizó a 25°C y se permitió que la proteína se asocie y disocie durante 120s y 240s respectivamente, seguido de una etapa de inyección de regeneración de 30s de Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,05% a razón de 30 µl/minuto. Se utilizaron inyecciones por duplicado de cada analito y de la celda en blanco (tampón HBS-P) para producir datos adecuados para los cálculos cinéticos. Los datos se ajustaron asumiendo un modelo de
25 unión de Langmuir en una relación 1:1 utilizando la opción de análisis de estado estable disponible dentro del software BiaEvaluation 3.1 para determinar la constante de disociación de equilibrio K_D .

Cepas, condiciones de cultivo y cebadores

30 *M. genitalium* se cultivó en un medio SP-4 a 37°C en matraces de cultivo de tejidos. Se aislaron los mutantes sobre placas de agar de tipo SP-4 complementadas con puromicina (3 µg mL⁻¹). Se utilizó la cepa de *E. coli* XL1-Blue para las finalidades de clonación y amplificación de plásmidos. Se cultivó en un caldo LB o en placas de agar que contenían 100 µg mL⁻¹ de ampicilina. Todos los cebadores utilizados en este trabajo se detallan en la
35 Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Cebador utilizado.

Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	SEQ ID NO:
Pac-F	GCGGAATTCTAGTATTTAGAATTAATAAAGTATGACTGAATATAAACCTACTG	SEQ ID NO: 4
Pac-R	GCGGGATCCCTCGAGAATCTATGTCGACTTAAGCACCCAGGTTTTCTAG	SEQ ID NO: 5
COMmg192-F	AGTGGGCCCCACTAACAAAAACAAATTAGTGATGTGTTAGTGATTGTGTGAAAAAATTGTTTATAAATTAAAGTTTGTATGAAAACAATGAGAAAACAG	SEQ ID NO: 6
COMmg192-R	AGTCTCGAGCTAACTTTTGGTTTCTTCTG	SEQ ID NO: 7
S783Amg192-F	GAGTACTCCCCTTGCCGAGGAATTCAGTG	SEQ ID NO: 8
S783Amg192-R	CACTGAATTCCTCGGCAAGTGGGAGTACTC	SEQ ID NO: 9
W184Amg192-F	GGCAAGCAAATCAGGCCACCAGTCAACGCA	SEQ ID NO: 10
W184Amg192-R	TGCGTTGACTGGTGGCCTGATTTGCTTGCC	SEQ ID NO: 11
PPmg192-F	CCTAAACAACAATGCCAGTGCCAATGCTTCAACTG	SEQ ID NO: 12
PPmg192-R	CAGTTGAAGCATTGGCACTGGCATTGTTGTTTAGG	SEQ ID NO: 13
S458Dmg192-F	TCAATGGGAGTTTTGACATCCAAGACACCT	SEQ ID NO: 14
S458Dmg192-R	AGGTGTCTTGATGTCAAACCTCCATTGA	SEQ ID NO: 15
Loopmg192-F	ATCAATGGGAGTTTTTTTCAGCTTTGTTGTTTCCTTATTC	SEQ ID NO: 16
Loopmg192-R	AACAACAAAGCTGAAAAACTCCATTGATCGGAC	SEQ ID NO: 17
Tnp3	GATTCATGATTATATCGATCAAC	SEQ ID NO: 18
RTPCRmg192-R	CAGGGGCAATTGATTTAAGC	SEQ ID NO: 19
RTPCRmg192-F	TCCCCTAATGAATTGCGAAG	SEQ ID NO: 20
PacUp	GTAGCTAATCTAACAGTAGG	SEQ ID NO: 21
PacDw	GTCCTAGAACTTGGTGTATG	SEQ ID NO: 22
P110F	AGGAGATATACCATGGCACTGGCAAATACCTTTC	SEQ ID NO: 23
P110R	GTGATGGTGTATGTTTAGGCAGTGCTGCAAAC	SEQ ID NO: 24

Manipulación de AND y construcción de mutantes

El plásmido de ADN fue purificado utilizando el Kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific). Se extrajeron productos de la PCR y fragmentos de ADN de geles de agarosa utilizando un kit NucleoSpin Gel y PCR Clean-up (Macherey-Nagel), y fueron digeridos utilizando las correspondientes enzimas de restricción (Fermentas) cuando fuera necesario. Para la transformación de *M. genitalium*, se purificaron unos plásmidos utilizando un kit GenElute HP Midiprep (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante.

10

En primer lugar, se creó como supercántigo (scaffold) un mini-transposón (TnPac) que porta un marcador de puromicina seleccionable utilizando el plásmido pMTn*TetM438* (Pich, O.Q., et al. 2006. *Microbiology*, 152: 519-27). El gen que codifica la puromicina acetiltransferasa (*pac*) se amplificó a partir del plásmido pΔMG_218-lacZ (Torres-Puig, S., et al. 2015. *Nucleic Acids Res*, 43: 4923-36) utilizando los cebadores *pac-F* y *pac-R*, y el amplicón resultante fue digerido con *EcoRI* y *BamHI*. El marcador *tetM438* fue eliminado del plásmido

15

pMTn*TetM438* con *EcoRI* y *BamHI*, y el amplicón *pac* digerido de igual manera fue ligado en el vector pMTn vacío para crear el plásmido pMTnPac. Entonces, el gen MG_192 se amplificó a partir del cromosoma de la cepa G37 de *M. genitalium* utilizando los cebadores COMmg192-F y COMmg192-R. El amplicón fue digerido con las enzimas de restricción *Apal* y *XhoI* y ligado al plásmido pMTnPac digerido de forma similar, para crear el plásmido pTnPacP110WT. Este plásmido fue creado para reintroducir un alelo de tipo silvestre del gen MG_192 en el mutante Δ MG_192. El cebador COMmg192-F incluye la región upstream (antes del extremo 5') (70 nucleótidos) del gen MG_191, que contiene un fuerte promotor identificado en un estudio previo (Musatovova, O., et al. 2003. *FEMS Microbiol Lett*, 229: 73-81). Este promotor dirigirá la transcripción de la copia codificada por el transposón del gen MG_192 en todos los mutantes.

Las mutaciones diana en el gen MG_192 fueron introducidas utilizando oligonucleótidos mutados en un corte y empalme mediante PCR de extensión solapada PCR (SOE-PCR). Para generar una mutación S783A, se amplificaron por PCR dos segmentos solapados que abarcan la totalidad del gen MG_192 utilizando los cebadores COMmg192-F/S783Amg192-R y S783Amg192-F/ COMmg192-R y el ADN del plásmido pMTnPacP110WT como molde. A continuación, ambos fragmentos de ADN se unieron en una reacción SOE-PCR utilizando los cebadores COMmg192-F y COMmg192-R. El fragmento resultante fue clonado en un plásmido pMTnPac tal como se ha descrito anteriormente para generar el plásmido pMTnPacP110S783A. Se siguió una estrategia similar para generar los plásmidos pMTnPacP110W184A, pMTnPacP110S458D, pMTnPacP110PP y pMTnPacP110 Δ loop, utilizando los cebadores W184Amg192-F/R, Ppmg192-F/R, loopmg192-F/R y S458Dmg192-F/R, respectivamente. El análisis de secuenciación de los diferentes mini-transposones TnPacP110 utilizando los cebadores Tnp3, RTPCR192-F, RTPCR192-R y PacUp, excluyó la presencia de mutaciones adicionales dentro de la secuencia del MG_192. Además, las reacciones de secuenciación confirmaron la presencia en los alelos de tipo silvestre además de en los alelos del MG_192 mutante del mismo número de tripletes AGT, que codifica una sección de diez residuos de serina que se encuentran en el centro de la proteína P110. La identificación del sitio de inserción del mini-transposón en los mutantes se realizó por secuenciación utilizando el cebador PacDw y el ADN cromosómico como molde.

Transformación y cribado

El mutante de *M. genitalium* Δ MG_192 se transformó mediante electroporación utilizando 5 μ g del ADN del plásmido de los diferentes mini-transposones, tal como se ha descrito previamente (Pich, O.Q., et al. 2009. *PLoS One*, 4: e7452). Las colonias resistentes a

puromicina se recogieron, propagaron y almacenaron a -80 °C. Para las finalidades del cribado, se propagaron adicionalmente las cepas en matraces de cultivo de tejidos de 25 cm² con puromicina y se lisaron utilizando 0,1 M Tris-HCl a un pH 8,5, Tween-20 al 0,05% y 250 µg mL⁻¹ de Proteinasa K durante 1 hora a 37°C. A continuación, la Proteinasa K fue
 5 inactivada a 95°C durante 10 minutos. Se realizó el cribado para los lisados de *M. genitalium* por secuenciación utilizando los cebadores PacUp y PacDown. Por otro lado, los alelos del MG_192 fueron completamente re-secuenciados para descartar la presencia de las mutaciones no deseadas.

10 Reacciones de secuenciación

Las reacciones de secuenciación se realizaron con el kit BigDye® v3.1 Cycle Sequencing utilizando 2,5 µL de ADN genómico, siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las reacciones de secuenciación se analizaron utilizando un Analizador Genético ABI PRISM 3130xl en el Servei de Genòmica i Bioinformàtica (Universidad Autónoma de Barcelona).

15

SDS-PAGE

Se obtuvieron lisados celulares de cultivos de fase semi-logarítmica cultivados en matraces de 75 cm². La concentración de proteína se determinó con el Kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) y se separaron cantidades similares de la proteína total por
 20 electroforesis SDS-PAGE siguiendo los procedimientos estándar.

Ensayo cuantitativo de hemadsorción

La hemadsorción fue cuantificada utilizando citometría de flujo tal como se ha descrito previamente (Garcia-Morales, et al. 2014. *PLoS One*, 9: e87500) con pocas
 25 modificaciones. Se utilizaron 10⁹ células de micoplasmas durante el ensayo de hemadsorción. Fueron adquiridos datos FACS utilizando el aparato FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado con un láser de argón de 488 nm enfriado por aire y se analizó con el software CellQuest-Pro y FACSDiva (Becton Dickinson).

30 II. RESULTADOS

Estructura cristalina de la P110 de *M. genitalium*

Se obtuvieron cristales de la región extracelular de la adhesina P110 de *M. genitalium* (erP110) (residuos 23-938 de SEQ ID NO: 1). Por tanto, la erP110 no incluye ni los residuos
 35 correspondientes a la secreción del péptido señal (residuos 1-22) ni a las regiones transmembrana e intracelular (938-1052) en los extremos N- y C- de la P110,

respectivamente (Figura 1). La estructura de la erP110 se resolvió por difracción anómala simple (SAD) y modificación de la densidad a una resolución de 2,95 Å (ver los procedimientos experimentales) (Figura 2A). Se localizaron seis sitios de selenio en la unidad asimétrica del cristal, que contiene únicamente una subunidad erP110 donde el
5 disolvente ocupa el 67% del volumen. Los mapas iniciales permitieron construir un modelo parcial que fue completado y refinado con datos a 2,7 Å, proporcionando factores de fiabilidad R y R_{free} de 18,4/22,9, respectivamente.

La estructura de erP110 consiste en un dominio N- grande (residuos Ala25-Asp812) y un
10 dominio C- más pequeño (residuos Thr813-Leu936) (Figura 2A). El dominio N- presenta una topología de tipo hélice de lámina β (β -sheet propeller) con siete hojas consecutivas correspondientes a las láminas β I, II, III, IV, V, VI y VII (Figura 2A). La organización de tipo hélice enrollada tiene como resultado que cada lámina β se encuentra en contacto con la siguiente lámina β en secuencia (I con II, II con III, y así sucesivamente hasta cerrar la
15 hélice, VII con I). Las láminas β tienen cuatro cadenas antiparalelas, excepto la lámina β I que tiene tres. Las conexiones entre las cadenas β varían ampliamente en longitud y por consiguiente el número de residuos que cada lámina β abarca es muy diverso, encontrándose en un rango de 26 a 197 para las láminas β I y IV, respectivamente (Thr27-Asp53 (I), Ala67-Leu132 (II), Ser300-Trp339 (III), Ala382-Pro579 (IV), Asn624-Phe686 (V),
20 Thr697-Thr772 (VI) y Gln774-Asp812 (VII)). La longitud de enlaces entre las láminas β es también muy diversa, situándose desde cero residuos, entre las láminas VI y VII, a 168 residuos, entre las láminas II y III. Los residuos de las conexiones largas, tanto entre las cadenas β como las láminas β , se agrupan entre sí creando una estructura similar a una corona por encima de las láminas β III, IV y V. El centro de la hélice no está ocupado por
25 residuos de proteínas y se forma una cavidad, que conecta las dos caras de la hélice, que transcurre paralela a las siete cadenas β de alrededor, una de cada una de las siete láminas β . La búsqueda para la homología estructural más cercana con el DALI server (Holm, L. & Rosenstrom, P. 2010. *Nucleic Acids Res*, 38: W545-9) dio como resultado una desviación de la desviación cuadrática media (r.m.s.d.) de 3,6 Å para 255 residuos con Virginiamicina B
30 Liasa (Figura 3), una enzima bacteriana de degradación del antibiótico que pertenece a la superfamilia de tipo hélice de lámina β de siete hojas. El dominio C de erP110 presenta un pliegue compacto, con un barril β de cinco cadenas anti-paralelas, una horquilla β y cuatro hélices α pequeñas. Únicamente fueron encontradas unas homologías estructurales débiles por DALI para el dominio C, con las puntuaciones Z por debajo de 4 y menos del 50% de
35 residuos equivalentes. El dominio C sobresale radialmente (~40 Å) de la hélice que

interactúa con las láminas β I, VII y también, aunque de forma menos extensa, con la lámina β II.

La forma global de erP110 puede describirse como una letra **P** mayúscula (de ~120 Å de longitud), donde la parte redondeada y el pie de la **P** corresponden a los dominios N- y C-, respectivamente (Figura 4A). En esta representación, el extremo C- del dominio C se sitúa en la parte inferior de la **P**, mientras que la corona se encuentra en la parte superior de la **P** por encima de las láminas β de la hélice que se sitúan opuestas al dominio C. Se espera que el extremo C- de la erP110, que se predice que está seguido por la hélice transmembrana (Figura 1), esté cerca de la superficie exterior de la membrana de micoplasmas (Figura 4A). Las imágenes de microscopio electrónico reconstruidas de NAPs, obtenidas a una resolución de 15 – 20 Å mediante contraste negativo de NAPs purificadas y también mediante criotomografía de células de micoplasmas y cálculo de la media computacional de subtomografías de NAPs, presentan una región globular grande que conecta con la membrana celular mediante un tallo (Scheffer, M.P. et al. 2017. *Mol Microbiol.* 105(6): 869-879). Esta forma global de las NAPs, compuestas tanto de P110 como de P140, puede encajar bien con la organización de la erP110 con el dominio grande de tipo hélice β y el dominio C pequeño y alargado.

La densidad de electrones está bien definida para todos los residuos del dominio C. Por el contrario, la densidad es pobre en cuatro regiones del dominio N donde ~25 residuos no pudieron ser modelados. Tres de estas cuatro regiones desordenadas corresponden a bucles flexibles expuestos a disolvente en la parte superior de la corona (residuos 413-416, 468-477 y 593-602), incluyendo una sección de once residuos de serina contiguos (409-419). La cuarta región desordenada, alrededor del residuo Gly257 (no modelada), se sitúa en la parte inferior de la corona y corresponde a una inserción grande en MPN142, la proteína ortóloga de la P110 en *M. pneumoniae*. Es interesante comentar que tres de las cuatro regiones desordenadas, con la excepción de la región (residuos 593-602 de la SEQ ID NO: 1), corresponden a repeticiones MgPar del gen P110. De hecho, la sección de poli-serina (poli-“AGT”) se sitúa dentro de la gran repetición denominada como KLM (residuos 42 a 517), con homología con las MgPars 2, 8 y 9, que contienen 16, 10 y 9 tripletes “AGT” respectivamente. El empaquetamiento de cristales deja la corona del dominio N-terminal mayoritariamente libre de interacciones con otras subunidades. La accesibilidad de la corona ha contribuido decisivamente a la hora de obtener cristales de complejos de erP110 con oligosacáridos sialilados (ver más adelante).

Complejos de P110 con oligosacáridos sialilados 3SL y 6SL

Tal como se ha mencionado anteriormente, los oligosacáridos sialilados han demostrado ser los principales receptores del huésped en *M. pneumoniae* y en algunos otros micoplasmas con capacidad de desplazamiento transmembrana. Por lo tanto, nos centramos en oligosacáridos sialilados cuando comenzamos a buscar posibles interacciones de la erP110 con los receptores de células de *M. genitalium*. La co-cristalización de erP110 con 3'-sialilactosa (3SL: donde el ácido neuramínico forma un enlace α 2-3 a un monosacárido de lactosa) o bien 6'-sialilactosa (6SL: con un enlace α 2-6) dio como resultado unos complejos de tanto oligosacáridos con erP110, según se determina a una resolución de 2,2 y 2,5 Å, respectivamente (sección de procedimientos experimentales). El sitio de unión a oligosacáridos, el mismo para ambos complejos, está situado en una muesca de la erP110 en la parte superior de la corona (Figura 4A). En ambos complejos únicamente la fracción de ácido neuramínico presenta interacciones directas con dos extensiones cortas de la proteína: Pro197-Ser198-Pro199-Asn200 (SEQ ID NO: 2) y Ser456-Phe457-Ser458. El grupo carboxilato del ácido neuramínico forma dos enlaces de hidrógeno con Ser458, uno con el grupo amino de la cadena principal y el segundo con el oxígeno de la cadena lateral. El ácido neuramínico también hace otro enlace de hidrógeno con la cadena lateral de Asn200 y cuatro más (tres para 3SL) con la cadena principal. Finalmente, el grupo metilo del ácido neuramínico se sitúa en una cavidad hidrófoba cerca a la cadena lateral de Phe457. Trp184 parece importante para conformar la cavidad de unión, aunque sin interactuar directamente con los oligosacáridos enlazados (Figura 4B y 4C). En las estructuras refinadas, los oligosacáridos presentan diferentes grados de ocupación (~100% para 6SL y ~60-70% para 3SL), lo que sugiere diferentes afinidades de unión a pesar del hecho de que el ácido neuramínico está realizando prácticamente las mismas interacciones en ambos complejos. La fracción de lactosa de 6SL también está bien definida en el complejo 6SL, mientras que la densidad es progresivamente más débil para 3SL lo que sugiere que, más allá del ácido neuramínico, la conformación de este oligosacárido puede fluctuar. El tercer monosacárido se aproxima a la proteína 6SL, mientras que se proyecta hacia el disolvente en 3SL (Figura 4B y 4C).

No se encontraron similitudes entre P110, con un contenido de serina del 12%, y la familia de repeticiones ricas en serina de las Adhesinas (SRR). Sin embargo, las interacciones y la conformación de la fracción de ácido siálico enlazada a la P110 presentan similitudes con las vistas en las proteínas SRR GspB (*Streptococcus gordonii*) y SrpA (*Streptococcus sanguinis*) que implican principalmente un tripéptido X-Tyr/Phe-Ser/Thr (residuos 456-458 en la P110) (Figura 5). El grupo carboxílico del ácido siálico apunta hacia el primer residuo en

el tripéptido (Ser/Thr), mientras que el grupo amida de hidrógeno siálico se enlaza al grupo carbonilo del tercer residuo. La posición Ser/Thr ha demostrado ser de vital importancia para la unión con mutaciones de un único punto en SrpA que presentan una reducción drástica en la unión a las plaquetas humanas. Para la P110 la variante de la cepa *M. genitalium* con la sustitución S458D no fue capaz de producir proteína (ver más adelante). Más aún, en las tres estructuras el grupo metilo siálico se sitúa en una cavidad hidrófoba creada por el residuo aromático del tripéptido (Figura 5). Los residuos fuera del tripéptido pueden contribuir a la unión de oligosacáridos siálicos a través de las interacciones específicas que difieren entre diferentes proteínas (Figura 5). Por tanto, mientras que unos pocos residuos de arginina son determinantes en SrpA (Arg342 y Arg347) y GspB (Arg484), algunas prolinas (Pro197 y Pro199) parecen ser de vital importancia en la P110 (ver más adelante). La afinidad entre erP110 y los compuestos de ácido siálico fue caracterizada experimentalmente por resonancia de plasmón superficial utilizando 3SL y 6SL biotinilados inmovilizados en un chip de streptavidina (Figura 6A). Las constantes de disociación de equilibrio (K_D), determinadas a partir de las isothermas en estado estable utilizando un modelo de Langmuir en una relación de 1:1, muestran una afinidad para 6SL ($K_D = 2,7 \mu\text{M}$) que es casi dos veces la encontrada para 3SL ($K_D = 5,0 \mu\text{M}$), lo que podría explicar el bajo grado de ocupación observado para 3SL en los complejos erP110.

20 **Citoadherencia de las cepas de *M. genitalium* que portan mutaciones diana en P110**

La estructura de P110 en complejo con oligosacáridos sialilados reveló los residuos candidatos para la unión. Para evaluar la implicación de estos residuos en la citoadherencia, se realizó mutagénesis dirigida para generar las variantes P197A, P199A, W184A, S458D, delección del bucle S458-T462 y el mutante doble de Prolinas P110-P. Los alelos mutantes de MG_192 resultantes se introdujeron en *M. genitalium* mediante administración con transposón y se seleccionaron con el marcador resistente a puromicina (*pac*). Para evitar la presencia de dos copias diferentes del gen MG_192 en el cromosoma, los diferentes transposones de TnPacP110 fueron introducidos en un fondo de mutantes de ΔMG_192 (Burgos, R. et al. 2006. J Bacteriol, 188: 8627-37). Para finalidades de control, se administró también una copia de tipo silvestre del gen MG_192 a la cepa que carece de P110, utilizando el mismo mini-transposón.

Tras la transformación de la cepa ΔMG_192 , se aislaron, propagaron y almacenaron varios mutantes resistentes a la puromicina. En primer lugar, se determinó el sitio de inserción del mini-transposón en estos transformantes. Se observó que los sitios de inserción se encontraban dentro del marcador de resistencia a la tetraciclina (*tetM*) en aproximadamente

la mitad de los clones analizados (Figura 7). El marcador *tetM* fue utilizado previamente para crear y seleccionar el mutante de Δ MG_192. Los inventores establecieron la hipótesis de que los clones que llevan las copias del MG_192 dentro del marcador *tetM* presentan una adecuación superior. Sin embargo, el mini-transposón también se encontró introducido en
5 otros genes, tales como MG_018, MG_238, MG_244 y MG_293 en otros transformantes. Digno de mención, la localización de los alelos mutantes de MG_192 en el mismo contexto génico y genómico en diferentes cepas facilita la caracterización fenotípica y su posterior comparación. Por esta razón, los mutantes que portan el mini-transposón TnPacP110 dentro del marcador *tetM* fueron seleccionados para un análisis adicional.

10

Se analizaron lisados celulares completos de la cepa de tipo silvestre, el mutante de Δ MG_192 y clones representativos que portaban los alelos de tipo silvestre o mutantes de MG_192 mediante SDS-PAGE (Figura 6B). Se observó que la banda correspondiente a la proteína P110 estaba ausente en el perfil proteico del mutante de Δ MG_192. Además, la
15 cantidad de proteína P140 se vio marcadamente reducida en este mutante. Los niveles de P110 y P140 fueron restaurados en la mayoría de las P110-WT, P110-S786A, P110-W184A y P110-PP complementadas. Sin embargo, la presencia de P110 no fue detectada en los transformantes que portaban la mutación S458D o la delección de los residuos Ser458 a Thr462 (mutante de Δ loop). A la luz de este descubrimiento, los dos últimos mutantes no se
20 caracterizaron en mayor detalle. Sorprendentemente, mientras que el mutante S458D se produjo *in vitro* de forma similar a la erP110 de tipo silvestre, la variante Δ loop se obtuvo, mediante filtración en gel, en una distribución homogénea que no fue posible purificar. Estas observaciones sugieren que el bucle es estructuralmente de vital importancia, donde Ser458 es importante para el procesamiento adecuado y la estabilidad de P110 *in vivo*.

25

La citoadherencia de los micoplasmas se evalúa habitualmente por hemadsorción, la capacidad de adherirse a los glóbulos rojos. Se utilizó citometría de flujo para determinar de forma cuantitativa la capacidad de hemadsorción de la cepa de tipo silvestre (G37), mutante Δ MG_192 y los clones representativos que portan los alelos de tipo silvestre o mutantes de
30 MG_192. Se mezclaron cantidades fijas de células de micoplasmas con concentraciones crecientes de glóbulos rojos humanos y se sometieron a tinción utilizando SYBR green. La unión de las células de micoplasmas a los glóbulos rojos pueden modelarse en una función cinética inversa de la isoterma de Langmuir (Figura 6C). Tal como se esperaba, las células de la P110-WT reconstituida mostraron una capacidad de hemadsorción similar a la de las
35 células WT. De igual manera, la capacidad de hemadsorción del mutante P110-S786A fue comparable a la P110-WT (datos no mostrados). En contraste, a pesar de que se observó

algo de unión, la capacidad de hemadsorción del mutante P110-W184A se redujo considerablemente. Más aún, nuestros resultados indican que las células del mutante P110-PP a penas se unen a los eritrocitos y por consiguiente, los datos de hemadsorción no se ajustan a una curva de la isoterma de Langmuir. Este comportamiento es el esperado para
 5 mutantes con graves defectos de citoadherencia. En conjunto, nuestros resultados indican que Trp184, Pro197 y Pro199 juegan una función clave en la interacción de *M. genitalium* con los receptores de las células hospedadoras.

Unión de potasio a P110

10 Las estructuras de los complejos con oligosacáridos también muestran un ion de potasio enlazado al dominio C, que estaba ausente en la estructura de apo-erP110 (Figura 8). Se añadió potasio como citrato de tri-potasio durante la co-cristalización con ambos oligosacáridos y su presencia en el cristal fue confirmada por espectroscopia de fluorescencia de rayos X. En su lugar, no se utilizó potasio para la cristalización de apo-
 15 erP110. Para revisar si la unión del potasio a la P110 es independiente de la unión de los oligosacáridos, se prepararon nuevos cristales añadiendo únicamente potasio (100 mM). La nueva estructura, determinada a 2,4 Å de resolución, mostró claramente la presencia del potasio enlazado al dominio C, mientras que el sitio de unión a oligosacáridos en el dominio N estaba vacío. El sitio de unión del ion de potasio se localizó en una jaula hidrófila del
 20 dominio C cerca de la interfaz con el dominio N (Figura 8A). El potasio se encuentra coordinado con tres oxígenos de la cadena principal (de los residuos Thr831, Arg834 y Gly839), con dos moléculas de agua y con uno de los oxígenos del carboxilato de Asp836 (Figura 8B). La jaula está cubierta por la cadena lateral de Tyr830, que mantiene todos los átomos de carbono del anillo fenólico a ~4Å del potasio. En ausencia de potasio, la jaula de
 25 unión se abre reorientando la cadena lateral de Tyr830, y la cadena lateral de Asp836 gira en el exterior de la jaula donde su grupo carboxílico apunta hacia la cadena lateral desplazada de Arg834 de una subunidad erP110 relacionada con el doble plegamiento de la estructura cristalina (Figura 8C). Estos cambios también dan como resultado algunas reorganizaciones de los residuos vecinos, en particular Pro877 y Pro926. Las orientaciones
 30 relativas del dominio N y el dominio C son esencialmente idénticas (con diferencias menores de 2°) en las cuatro estructuras de erP110 determinadas. Aunque se han descrito muchas funciones para los iones de potasio, su función en la P110 no está clara.

III. CONCLUSIÓN

35

Para conseguir una comprensión de la función de la maquinaria de citoadherencia de los micoplasmas, en esta invención se ha determinado la estructura cristalina de la P110, una adhesina fundamental de *M. genitalium* y una proteína inmunodominante de este patógeno emergente de transmisión sexual.

5

La unión de la P110 a oligosacáridos sialilados se caracteriza por interacciones de la fracción de ácido neuramínico con el tripéptido Ser456-Phe457-Ser458. Estas interacciones son compartidas con otras adhesinas bacterianas que se unen a oligosacáridos sialilados mediante el motivo de unión tripeptídico X-Phe/Tyr-Ser/Thr. Además de este patrón común de interacciones, la unión a la fracción de ácido neuramínico se ve reforzada en la P110 con unas interacciones específicas que implican principalmente los residuos Pro197-Ser198-Pro199-Asn200 (SEQ ID NO: 2). Se confirmó que el sitio de unión a oligosacáridos sialilados en la P110, por ensayos de mutagénesis y hemadsorción, es de vital importancia para iniciar la unión a las células humanas. Por lo tanto, los oligosacáridos sialilados parecen ser los principales receptores de la célula hospedadora en una infección por *M. genitalium*. Los resultados presentados en esta invención también proporcionan la primera evidencia experimental para la unión de una proteína, la P110, a compuestos sialilados en *M. genitalium*. De forma destacada, los alineamientos de secuencias indican que los residuos importantes en el sitio de unión en la P110 se conservan en su proteína homóloga MPN142 de *M. pneumoniae* (Figura 9A). Hasta ahora, no está claro si la P140, la compañera de la P110 en el complejo NAP, puede también unirse a compuestos sialilados, pero los experimentos realizados con P1 (MPN141), homóloga a P140 en *M. pneumoniae*, no detectaron interacciones de esta proteína con glicoproteínas sialiladas.

Las regiones variables de MgPar, KL (residuos 42 a 294 de la SEQ ID NO: 1) y LM (residuos 462 a 517 de la SEQ ID NO: 1) corresponden, en la estructura de la P110, a extensiones del dominio N sumamente accesibles al disolvente (Figura 9B). De forma notable, dentro de estas regiones variables, los residuos importantes para la unión a oligosacáridos parece que permanecen mayoritariamente constantes tal como se espera si la funcionalidad del sitio de unión ha de conservarse. La sección poli-“AGT” de longitud variable, que se encuentra dentro de la repetición KLM extendida, también sobresale como un bucle desordenado de la superficie de la P110 en la cercanía del sitio de unión a oligosacáridos. Por lo tanto, todas las variantes potenciales naturales de P110 generadas por recombinación dan como resultado una superficie expuesta al disolvente altamente variable que rodea una cavidad del sitio de unión al receptor celular altamente conservada (Figura 9A y 9B). Este diseño estructural protegería este sitio esencial de la P110 desviando la respuesta del sistema

inmune a las regiones variables. Estos resultados mostrados en la presente invención ofrecen estrategias alternativas para bloquear las primeras etapas de la infección por *M. genitalium*, que está evolucionando hacia lo que se denomina una súper bacteria debido a su resistencia a antibióticos y lo que se considera una amenaza a la salud pública global.

5

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto con capacidad para inhibir la adhesión celular de *Mycoplasma* sp. a la célula hospedadora para su uso en el tratamiento y/o la prevención de *Mycoplasma* sp. o una enfermedad asociada a una infección de *Mycoplasma* sp. en un sujeto.
5
2. Compuesto según la reivindicación 1, donde el compuesto se une al sitio de unión al receptor de la adhesina P110 de *Mycoplasma genitalium* que comprende la secuencia Ser-Phe-Ser y/o la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2).
10
3. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, donde el compuesto es un análogo del receptor de la célula hospedadora de la adhesina P110 de *M. genitalium*, donde dicho compuesto comprende cualquiera de los grupos de ácido siálico monoméricos o multiméricos.
- 15 4. Compuesto según la reivindicación 3, donde el análogo es un oligosacárido sialilado, preferiblemente, 3-sialilactosa (3SL), 6-sialilactosa (6SL).
5. Compuesto según la reivindicación 2, donde el compuesto específicamente reconoce y se une a la secuencia Ser-Phe-Ser o a la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2).
20
6. Compuesto según la reivindicación 5, donde el compuesto es un anticuerpo o un fragmento del mismo.
7. Compuesto según la reivindicación 1, donde el compuesto es un péptido que comprende la secuencia Ser-Phe-Ser y/o la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 3).
25
8. Compuesto según la reivindicación 7, donde el péptido es entre 15 y 3 aminoácidos de longitud, preferiblemente, entre 4 y 8 aminoácidos de longitud.
- 30 9. Compuesto según la reivindicación 7 u 8, donde el péptido comprende la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2) y/o la secuencia Gly-Ser-Phe-Ser-Ile (SEQ ID NO: 3).
10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el *Mycoplasma* sp. es *M. genitalium*.
35

11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la enfermedad asociada a una infección por *Mycoplasma* sp. se selecciona de la lista que consiste en meningitis aséptica, neuropatía periférica, ataxia cerebelar, insuficiencia renal, pancreatitis, pericarditis, miocarditis, anemia hemolítica, uretritis, cervicitis y enfermedad inflamatoria
5 pélvica.
12. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el sujeto es un mamífero, preferiblemente un humano.
- 10 13. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el compuesto está comprendido en una composición, particularmente, una composición farmacéutica.
14. Un péptido que comprende la secuencia Ser-Phe-Ser y/o la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2).
15
15. Péptido según la reivindicación 14, donde el péptido es entre 15 y 3 aminoácidos de longitud, preferiblemente, entre 4 y 8 aminoácidos de longitud.
16. Péptido según la reivindicación 14 o 15, donde el péptido comprende la secuencia Pro-
20 Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2) y/o la secuencia Gly-Ser-Phe-Ser-Ile (SEQ ID NO: 3).
17. Una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16.
- 25 18. Un vector que comprende la secuencia de nucleótidos según la reivindicación 17.
19. Una célula que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 17 y/o un vector según la reivindicación 18.
30
20. Un anticuerpo que se une específicamente a un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16.
21. Una composición que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 14
35 a 16, una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 17, un vector según la

reivindicación 18, una célula según la reivindicación 19 y/o un anticuerpo según la reivindicación 20.

22. Una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 12, un vector según la
5 reivindicación 13, una célula según la reivindicación 14 y/o un anticuerpo según la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección por *Mycoplasma* sp. o una enfermedad asociada a una infección por *Mycoplasma* sp. en un sujeto.

10 23. Un método *in vitro* para el cribado de compuestos útiles para el tratamiento y/o la prevención de infecciones causadas por *Mycoplasma* sp. en un sujeto, que comprende
a) poner el compuesto que va a ser sometido a ensayo en contacto con el sitio de unión al receptor de la adhesina P110 de *M. genitalium*, o con un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, y
15 b) analizar la unión entre el compuesto y el sitio de unión al receptor o el péptido del paso a), en donde el compuesto sometido a ensayo es de utilidad para el tratamiento y/o la prevención de infecciones causadas por *Mycoplasma* sp., cuando se detecta una unión en el paso b).

20 24. Método *in vitro* según la reivindicación 23, donde el sitio de unión al receptor de la adhesina P110 de *Mycoplasma genitalium* comprende la secuencia Ser-Phe-Ser y/o la secuencia Pro-Ser-Pro-Asn (SEQ ID NO: 2).

25. Un compuesto obtenido mediante un método según la reivindicación 23 o 24.

25

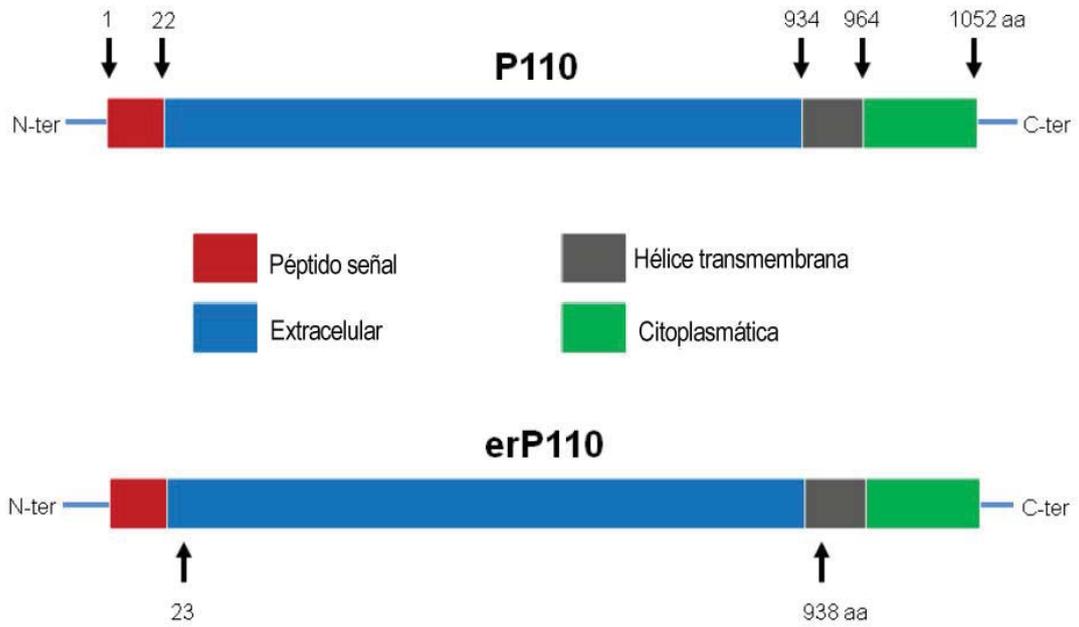


FIG. 1

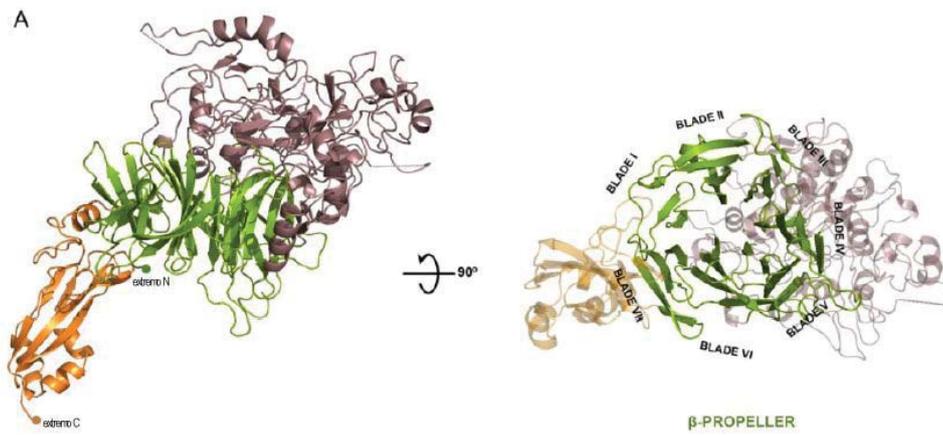


FIG. 2

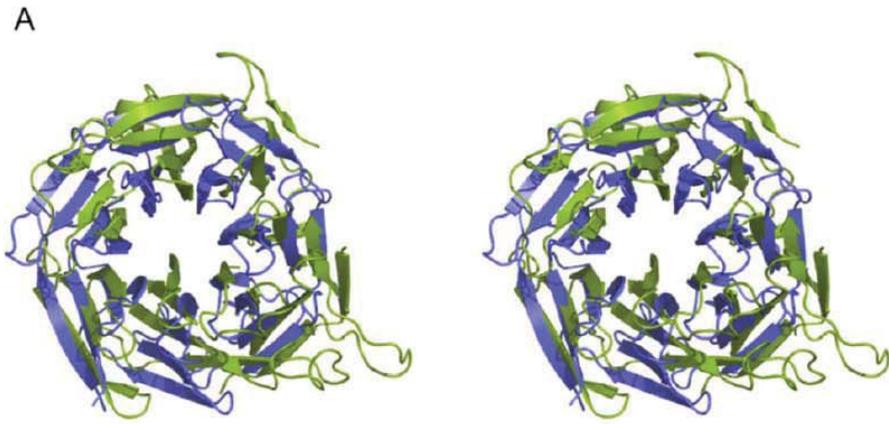


FIG. 3

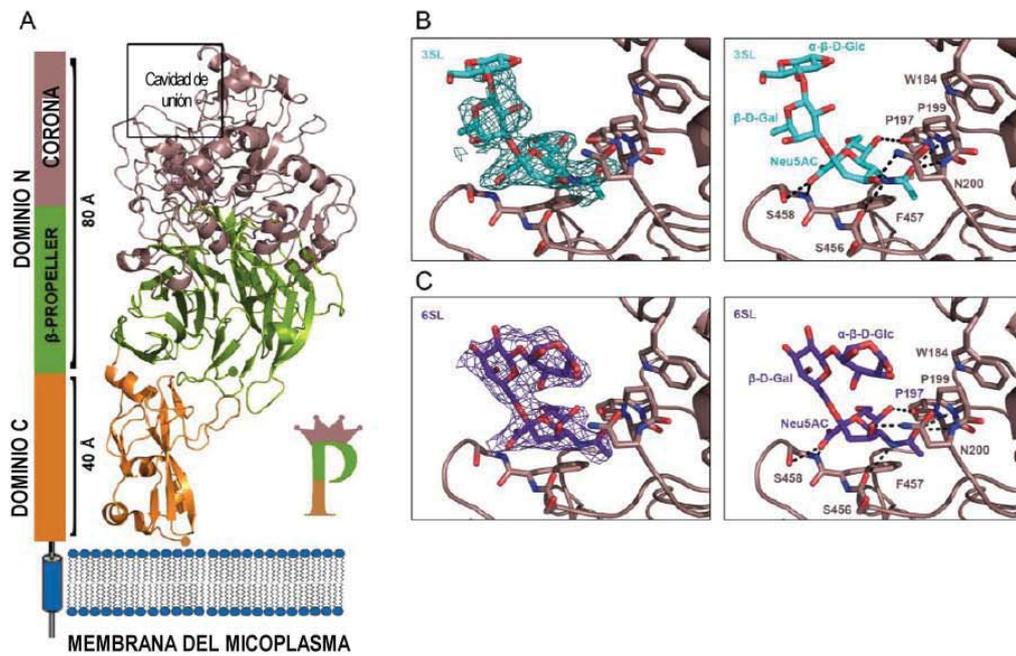


FIG. 4

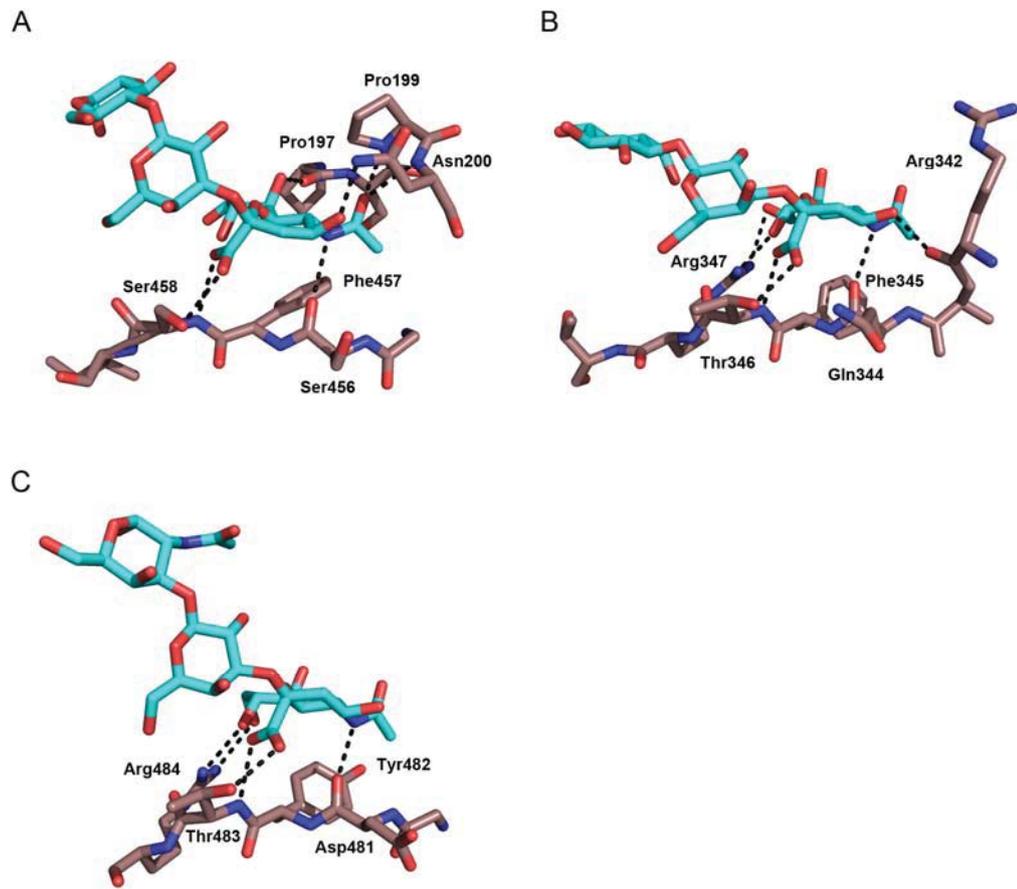


FIG. 5

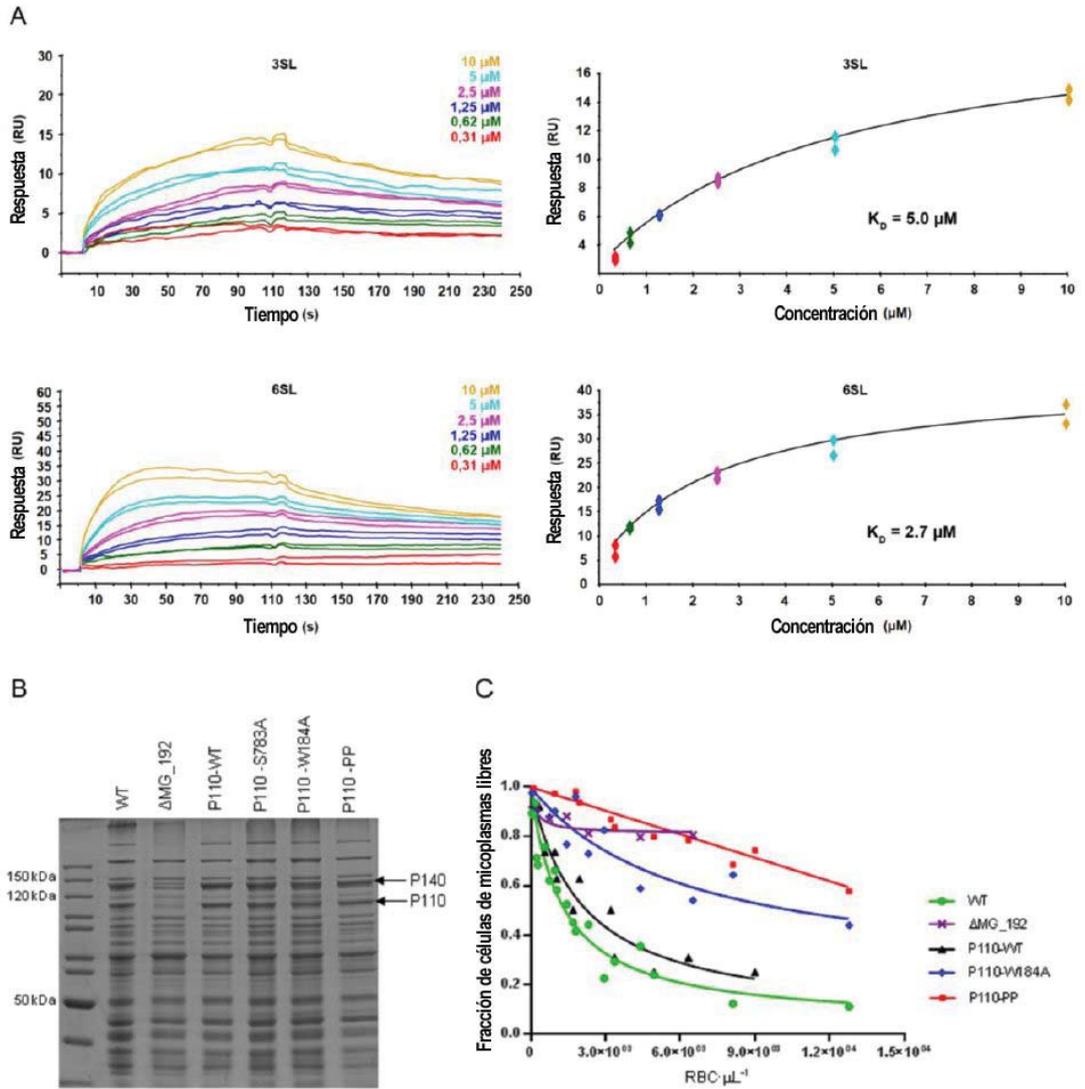


FIG. 6

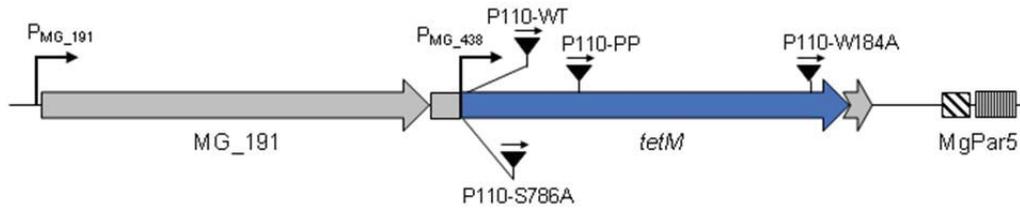


FIG. 7

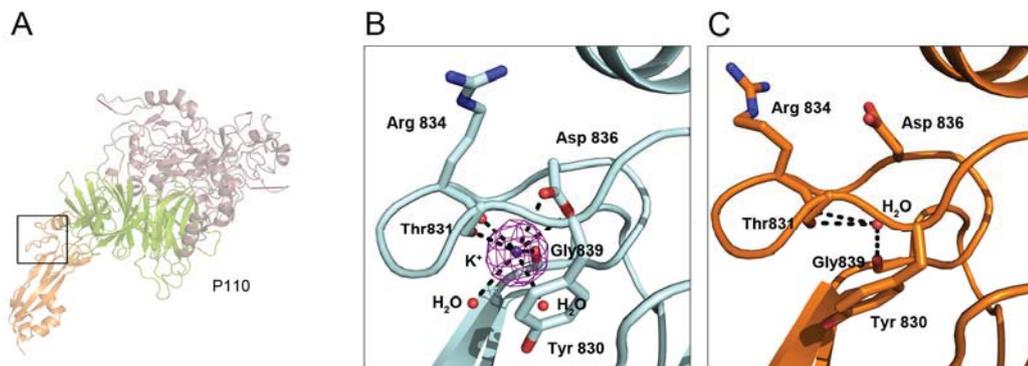
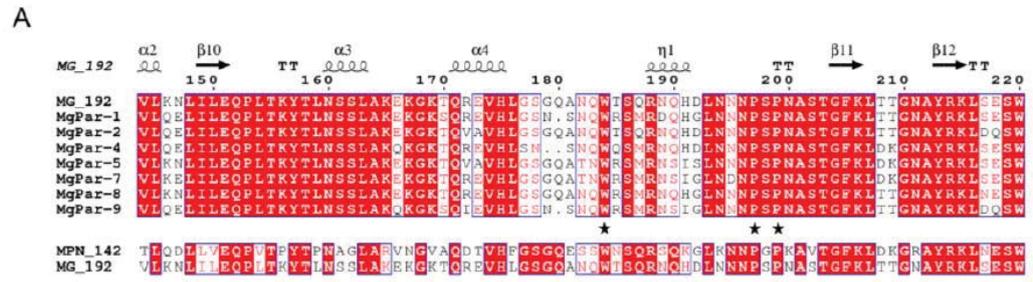


FIG. 8



MG_192: SEQ ID NO: 25; MgPAR-1: SEQ ID NO: 26; MgPAR-2: SEQ ID NO: 27;
 MgPAR-4: SEQ ID NO: 28, MgPAR-5: SEQ ID NO: 29, MgPAR-7: SEQ ID NO: 30;
 MgPAR-8: SEQ ID NO: 31; MgPAR-9: SEQ ID NO: 32; MPN_142: SEQ ID NO: 33

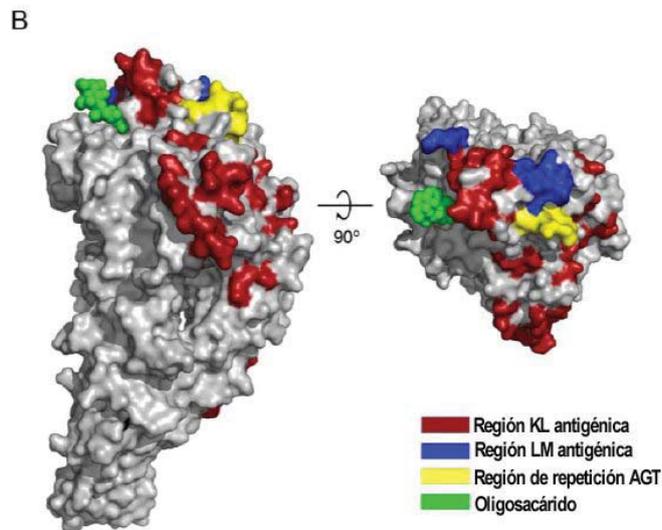


FIG. 9



②① N.º solicitud: 201830793

②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.07.2018

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ZAREI OMID et al. Peptide-based Polyclonal Antibody Production against P110 Protein of Mycoplasma genitalium. Avicenna Journal of Medical Biotechnology APR-JUN 2011. , 31/03/2011, Vol. 3, Páginas 79-85, ISSN 2008-2835(print) ISSN 2008-4625(electronic). Materiales y métodos; Resultados; Discusión	1
X	SVENSTRUP HELLE FRIIS et al. Adhesion and inhibition assay of Mycoplasma genitalium and M. pneumoniae by immunofluorescence microscopy. Journal of Medical Microbiology May, 2002. , 30/04/2002, Vol. 51, Páginas 361-373, ISSN 0022-2615. Resultados; Discusión	1
X	CN 104829692 A (UNIV NANHUA) 12/08/2015, todo el documento.	1
X	CN 104829693 A (UNIV NANHUA) 12/08/2015, todo el documento.	1
X	SACHSE K et al. Inhibition of Mycoplasma bovis cytoadherence by a monoclonal antibody and various carbohydrate substances. VETERINARY MICROBIOLOGY, 19930901 Elsevier BV, NL. Dr Stephen Collett, 01/09/1993, Vol. 36, Páginas 307 - 316, ISSN 0378-1135, <DOI: doi:10.1016/0378-1135(93)90097-Q>. Materiales y Métodos; Resultados.	1
A	IVERSON-CABRAL STEFANIE L et al. Analysis of the Mycoplasma genitalium MgpB Adhesion to Predict Membrane Topology, Investigate Antibody Accessibility, Characterize Amino Acid Diversity, and Identify Functional and Immunogenic Epitopes. PLoS One SEP 18 2015. , 18/09/2015, Vol. 10, Páginas Article No.: e0138244, ISSN 1932-6203(print) ISSN 1932-6203(electronic), <DOI: doi:10.1371/journal.pone.0138244>. todo el documento.	1-25
A	DENG XIANGYING et al. Three polypeptides screened from phage display random peptide library may be the receptor polypeptide of Mycoplasma genitalium adhesion protein. Microbial Pathogenesis JUL 2018., 28/04/2018, Vol. 120, Páginas 140-146, ISSN 0882-4010, <DOI: doi:10.1016/j.micpath.2018.04.058>. todo el documento.	1-25

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
24.04.2019

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/3



21 N.º solicitud: 201830793

22 Fecha de presentación de la solicitud: 31.07.2018

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SCHURWANZ NICOL et al. Strategy To Create Chimeric Proteins Derived from Functional Adhesin Regions of Mycoplasma pneumoniae for Vaccine Development. Infection and Immunity NOV 2009. , 31/10/2009, Vol. 77, Páginas 5007-5015, ISSN 0019-9567(print) ISSN 1098-5522(electronic), <DOI: doi:10.1128/IAI.00268-09>. todo el documento.	1-25
A	KRIVAN H C et al. ADHESION OF MYCOPLASMA-PNEUMONIAE TO SULFATED GLYCOLIPIDS AND INHIBITION BY DEXTRAN SULFATE. Journal of Biological Chemistry 1989. , 30/11/1988, Vol. 264, Páginas 9283-9288, ISSN 0021-9258. todo el documento.	1-25

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
24.04.2019

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
2/3

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61P31/04 (2006.01)

C07K7/08 (2006.01)

A61K38/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61P, C07K, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, EMBL-EBI, INTERNET