

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 971**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

A61K 39/104 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2014 PCT/US2014/042201**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14201305**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2014 E 14738954 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3008088**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para el tratamiento de infecciones por burkholderia**

30 Prioridad:

13.06.2013 US 201361834846 P

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

09.03.2020

73 Titular/es:

**RESEARCH INSTITUTE AT NATIONWIDE
CHILDREN'S HOSPITAL (33.3%)**

700 Children's Drive

Columbus, Ohio 43205 , US;

**UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA
(33.3%) y**

OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION (33.3%)

72 Inventor/es:

GOODMAN, STEVEN D.;

BAKALETZ, LAUREN O. y

AMER, AMAL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 746 971 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para el tratamiento de infecciones por *burkholderia*

Antecedentes

5 A lo largo de esta divulgación, las referencias, tales como publicaciones técnicas, científicas y de patentes, se indican entre paréntesis. Esta información se incorpora por referencia en su totalidad en la presente divulgación para describir más completamente el estado de la técnica y respaldar el asunto objeto reivindicado.

10 La fibrosis quística (CF) es el trastorno letal hereditario más común que afecta a los caucásicos (Campana et al. (2004) J. Cyst. Fibros. 3: 159-163). El mayor impacto de este trastorno genético es la incapacidad de los pacientes con CF para erradicar los patógenos bacterianos de sus pulmones. Como resultado, se desarrolla un estado infeccioso crónico, el cual incluye un círculo vicioso de proliferación bacteriana seguido de retirada hacia un estado de biopelícula extracelular adherido y/o invasión de células huésped locales. Con cada ciclo de proliferación aguda, se provoca una respuesta intensa del huésped, y en un intento por eliminar estas infecciones, la respuesta inflamatoria excesivamente exuberante causa daño a los tejidos pulmonares, dando como resultado cicatrices que deterioran la función pulmonar y a menudo son fatales. Incluso hoy, al menos el 90 % de los pacientes con CF muere por insuficiencia respiratoria. Las modalidades de tratamiento actuales dependen en gran medida del uso de antibióticos, sin embargo, ciertos patógenos siguen siendo altamente recalcitrantes al tratamiento con antibióticos, un fenotipo al que contribuye significativamente su capacidad de residir dentro de una biopelícula. Una vez que se produce la formación de biopelículas y se establece la infección en el pulmón con CF, la erradicación de bacterias es rara (George et al. (2009) FEMS Microbiol. Lett. 300: 153-164).

20 Mientras que el principal patógeno en pacientes adultos con CF es *Pseudomonas aeruginosa*, entre los patógenos asociados con CF más nocivos están los miembros del complejo *Burkholderia cepacia* (*Bcc*), y quizás el miembro más virulento sea *Burkholderia cenocepacia*, un patógeno oportunista Gram negativo. De las 17 especies formalmente nombradas dentro del complejo, *B. multivorans* y *B. cenocepacia* dominan en la CF (Simpson et al. (1994) J. Antimicrob. Chemother. 34:353-361; Butler et al. (1995) J. Clin. Microbiol. 33:1001-1004; Castellani et al. (1995) Arch Dis Child 73:276; LiPuma et al. (1995) N. Engl. J. Med. 332:820-821) que representan aproximadamente 85-97 % de todas las infecciones de *Burkholderia*. Si bien los pacientes con CF infectados con cualquier especie de *Bcc* a menudo tienen un pronóstico desfavorable, la infección por *B. cenocepacia* se considera más grave y se asocia tanto con una menor supervivencia como con un mayor riesgo de desarrollar un "síndrome de cepacia" mortal (Simpson et al. (1994) J. Antimicrob. Chemother. 34:353-361; Butler et al. (1995) J. Clin. Microbiol. 33:1001-1004; Castellani et al. (1995) Arch. Dis. Child. 73:276; LiPuma et al. (1995) N. Engl. J. Med. 332:820-821; Burns et al. (1999) Pediatr. Infect. Dis. J. 18:155-156; Hopkins et al. (2009) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 179:257-258; De Soyza et al. (2010) J. Heart. Lung Transplant 29:1395-1404; Nash et al. (2010) Transpl. Infect. Dis. 12:551-554). *B. cenocepacia* es intrínsecamente resistente a las polimixinas, aminoglucósidos y la mayoría de los β-lactámicos, y puede desarrollar resistencia a esencialmente todas las clases de fármacos antimicrobianos (Aaron et al. (2000) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 161:1206-1212; Golini et al. (2006) Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 25:175-180; Dubarry et al. (2010) Appl. Environ. Microbiol. 76:1095-1102).

40 *B. cenocepacia* ganó notoriedad como patógeno en la CF porque es difícil de identificar y tratar, y también debido a su capacidad de propagarse fácilmente entre las personas con CF. Incluso fuera de la CF, se ha demostrado que las cepas epidémicas altamente transmisibles de *B. cenocepacia* contaminan los entornos sanitarios y se propagan nosocomialmente (Graindorge et al. (2010) Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 66: 29-40). También es probable que la *B. cenocepacia* resistente a múltiples fármacos pueda transferir mecanismos de resistencia a otros microbios presentes dentro de las vías respiratorias humanas, y particularmente a los que co-colonizan el pulmón con CF. Esta suposición está respaldada por la observación de que 25-45 % de los pacientes adultos con CF están infectados crónicamente con múltiples bacterias resistentes a múltiples fármacos (Lechtzin et al. (2006) Respiration 73: 27-33).

45 La patogénesis de la enfermedad de las vías respiratorias con CF es multifactorial e incluye actividad antimicrobiana defectuosa en las secreciones de las vías respiratorias, aclaramiento mucociliar alterado, función anormal de la glándula submucosa y sobreproducción de especies reactivas al oxígeno (ROS). La inflamación crónica es más importante para la patogénesis de la CF como consecuencia de las infecciones pulmonares y conduce al daño pulmonar que resulta en el 85 % de las muertes. Una contribución adicional a la patología pulmonar mejorada observada en pacientes con CF es una superabundancia de macrófagos alveolares secretores de citoquinas. Los mediadores proinflamatorios tales como IL-1β, IL-8, TNF-α e IL-10 antiinflamatorio se detectan en pacientes con CF, incluso en pacientes jóvenes en ausencia de infección con cultivo positivo. Además, mientras que los macrófagos alveolares típicamente engloban a los microbios que obtienen acceso a los pulmones, los encierran en vacuolas las cuales se fusionan con los lisosomas donde los contenidos se degradan y eliminan mediante un proceso llamado autofagia, los macrófagos con CF son defectuosos en este sentido. Esta autofagia débil inherente (Luciani et al. (2010) Nat. Cell. Biol. 12: 863-875; Luciani et al. (2011) Autophagy 7: 104-106; Luciani et al. (2012) Autophagy 8) es además aumentada por la capacidad de *B. cenocepacia* para subregular las moléculas esenciales de autofagia (Abdulrahman et al. (2011) Autophagy 7: 1359-1370).

El documento WO 2011/123396 divulga polipéptidos recombinantes para su uso en la vacunación de individuos que padecen enfermedades de biopelícula crónicas o recurrentes y como agente terapéutico para aquellos con infecciones existentes.

5 El documento WO212/034090 divulga procedimientos para descomponer una biopelícula, o inhibir, prevenir o tratar una infección microbiana que produce una biopelícula, que implica la administración de un polipéptido que tiene uno o más dominios de caja HMG.

10 Gustave et al, Journal of Cystic Fibrosis, volumen 12, páginas 384-389, divulga el objetivo de los factores del huésped de integración bacteriana para destruir las biopelículas asociadas con la fibrosis quística. Brandstetter et al., The Laryngoscope, vol. 1233, páginas 2626-2632 divulga anticuerpos dirigidos contra factores del huésped de integración que median la eliminación de biopelículas de la nasopore. Estrella et al., Pharmaceuticals, volumen 3, páginas 1374-1393 describe una combinación de compuestos para el control de biopelículas y antibióticos como una forma de controlar las infecciones por biopelículas. Govan et al., Microbiol. Rev. tomo 60, páginas 539-574 describe la participación de *Pseudomonas aeruginosa* mucoide y *Burkholderia cepacia* en la patogénesis microbiana de la fibrosis quística.

15 La infección de un paciente con CF con *B. cenocepacia* se considera una sentencia de muerte virtual ya que estos pacientes son extremadamente difíciles de tratar y tampoco son elegibles para el trasplante de pulmón, a menudo su último recurso para salvar vidas. Por lo tanto, la necesidad de desarrollar enfoques novedosos y altamente efectivos para erradicar *B. cenocepacia* de los pulmones de pacientes con CF, así como de entornos médicos, no puede subestimarse. Esta invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

20 Sumario de la divulgación

Los inventores han identificado un objetivo proteico para el desarrollo de un enfoque novedoso para el tratamiento de las infecciones por CF. Esta proteína objetivo, un miembro de la familia DNABII de proteínas de unión al ADN, es esencial para la formación de biopelículas y la estabilidad de múltiples patógenos humanos (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4: 625-637; Justice et al. (2012) PLoS One 7: e48349; Gustave et al. (2012) J. Cyst. Fibros.) debido a su contribución al entramado estructural del ADN extracelular (ADNe) dentro de estas comunidades bacterianas. La familia DNABII es miembro de una clase de proteínas denominadas proteínas asociadas a nucleoides (NAPs), proteínas bacterianas que, en parte, dan forma al nucleoide bacteriano intracelular (Browning et al. (2010) Curr. Opin. Microbiol. 13: 773 -780). Además, esta familia es ubicua, expresada por prácticamente todas las eubacterias. Todos los miembros de la familia caracterizados hasta la fecha funcionan bien sea como un homodímero o heterodímero de subunidades. La familia se divide en dos tipos, HU (proteína similar a histona) e IHF (factor huésped de integración) con *B. cenocepacia* capaz de expresar ambos (genes de la cepa J2315: BCAL3530, *hupA*; BCAL1585, *hupB*; BCAL1487, *ihfA* y BCAL2949, *ihfB*) La principal distinción entre estos miembros de la familia es que HU se une al ADN de manera independiente de la secuencia, mientras que IHF se une a una secuencia de consenso [WATCAANNNTTR donde W es A o T y R es una purina, SEQ ID NO. 36] conservada en todos los géneros (Swinger et al. (2004) Curr. Opin. Struct. Biol. 14: 28-35). Todas las proteínas DNABII se unen y doblan el ADN considerablemente, por ejemplo *E. coli* IHF puede doblar el ADN en un giro en U virtual (Rice et al. (1996) Cell 87: 1295-1306). Además, todos los miembros de la familia tienen preferencia por las estructuras de ADN previamente dobladas o curvadas, por ejemplo uniones de Holliday, una estructura de tipo cruciforme central para la recombinación de ADN. De hecho, las proteínas DNABII funcionan como factores accesorios que facilitan todas las funciones intracelulares del ADN, incluida la expresión génica, la recombinación, la reparación y la replicación (Swinger et al. (2004) Curr. Opin. Struct. Biol. 14: 28-35).

En los últimos 20 años, múltiples investigadores descubrieron que estas proteínas también existen extracelularmente (Gao (2000) Los Ángeles: Universidad del Sur de California University of Southern California; Winters et al. (1993) Infect. Immun. 61:3259-3264; Lunsford et al. (1996) Curr. Microbiol. 32:95-100; Boleij et al. (2009) Infect. Immun. 77:5519-5527). Hasta la fecha, se han descrito tres funciones extracelulares. Primero, se demuestra que la HU estreptocócica provoca una potente respuesta inmune innata inflamatoria al inducir la liberación de TNF α e interleucina-1 (Zhang et al. (1999) Infect. Immun. 67: 6473-6477). De manera interesante, *B. cenocepacia* induce daño periférico al exacerbar la producción de IL-1 β a través del receptor del huésped P2Y₆ por un mecanismo aún desconocido (Gavrilin et al. (2012) Immunol. 188: 3469-3477; Kotrange et al. (2011) J. Leukoc. Biol. 89: 481-488). En este sentido, aún no se ha probado el papel extracelular de los miembros de la familia DNABII para *B. cenocepacia*. En segundo lugar, las proteínas extracelulares de DNABII se unen a la laminina y se cree que provocan el contacto directo con las células huésped (Winters et al. (1993) Infect. Immun. 61: 3259-3264). En tercer lugar, se sabe que las proteínas DNABII estabilizan la integridad estructural del ADNe dentro de la matriz o sustancia polimérica extracelular (o EPS) de la biopelícula de múltiples patógenos (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4: 625-637). Los antisueros dirigidos contra estas proteínas son suficientes para desestabilizar las biopelículas, dando como resultado la exposición/liberación de las bacterias residentes, sensibilizándolas así a la acción tanto de los antimicrobianos como de los efectores del sistema inmune (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4: 625 -637). Recientemente, también se ha demostrado que ambas subunidades de IHF son necesarias para una colonización eficiente de la vejiga urinaria por *E. coli* uropatógena y, además, que ambas subunidades de IHF influyen en la arquitectura comunitaria de las comunidades bacterianas intracelulares (Justice et al. (2012) PLoS One 7 : e48349). Sin pretender limitarse a ninguna teoría y considerando la abundancia de ADNe dentro de una biopelícula inducida

por *B. cenocepacia*, los inventores investigaron si existía un papel para la familia de proteínas DNABII en la estabilización de estas biopelículas y, por lo tanto, si esta familia de proteínas sirve como un objetivo para la intervención terapéutica. Además, la presencia de proteínas DNABII extracelulares, quizás en asociación con células bacterianas, podría influir en la interacción de *B. cenocepacia* con las células huésped y particularmente con su reservorio primario, el macrófago.

Por lo tanto, después de la investigación y el estudio, los inventores del presente documento divulgan un enfoque inmunoterapéutico que se dirige a las proteínas DNABII, y particularmente cuando se acopla con los agentes terapéuticos convencionales existentes, se encontró que es altamente efectivo tanto para reducir el volumen de las biopelículas formadas por *B. cenocepacia* así como para producir las bacterias ahora liberado de la biopelícula EPS susceptible a la acción de los antibióticos. Los procedimientos pueden usarse para disminuir y erradicar reservorios de *B. cenocepacia* de los pulmones de pacientes con CF. Además, se muestra que este procedimiento previene la recurrencia de la enfermedad de CF al inhibir la capacidad de *B. cenocepacia* de multiplicarse dentro de los macrófagos aislados de ratones con CF, un modelo animal importante de CF en humanos.

Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona una composición de anticuerpos para (i) usar en el tratamiento o prevenir la recurrencia de una infección por *Burkholderia* en un paciente con Fibrosis Quística (CF) que lo necesite, (ii) usar en el tratamiento de una infección o enfermedad causada por *Burkholderia* en un paciente con CF infectado con *Burkholderia*, en el que el anticuerpo reconoce y se une específicamente a la secuencia de aminoácidos RPGRNPKTGDVVPVSARRVV.

En otro aspecto, la invención proporciona un péptido aislado que consiste en la secuencia RPGRNPKTGDVVPVSARRVV y que opcionalmente comprende además un marcador adyuvante o detectable, así como un anticuerpo aislado que reconoce y une específicamente ese péptido, siendo el anticuerpo opcionalmente un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que opcionalmente comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención también proporciona una línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal y un polinucleótido aislado que codifica un péptido o el anticuerpo.

También se describe un procedimiento para tratar o prevenir la recurrencia de una infección microbiana en un paciente con CF o en un paciente en riesgo de desarrollar la infección microbiana, que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste aún además en administrar al sujeto una cantidad efectiva de un agente interferente, tratando o previniendo así la recurrencia de una infección microbiana en el paciente con CF.

Los agentes interferentes se pueden combinar con antimicrobianos para complementar además la terapia, por ejemplo, ceftazidima, ciprofloxacina, imipenem y minociclina. Por lo tanto, cualquiera de los procedimientos anteriores puede comprender adicionalmente, o consistir esencialmente en, o aún además consistir en la administración o contacto con una cantidad efectiva del antimicrobiano, por ejemplo, ceftazidima, ciprofloxacina, imipenem y minociclina. La administración o contacto del agente interferente se realiza en ausencia de un tratamiento con DNasa. El tratamiento con ADNsa que se excluye de la terapia comprende una enzima que cataliza la escisión de los enlaces fosfodiéster en el esqueleto del ADN. Tres ejemplos no limitantes de enzimas DNasa que se sabe que direccionan no solo las estructuras cruciformes, sino también una variedad de estructuras secundarias de ADN incluyen ADNsa I, T4 EndoVII y T7 Endo I. El tratamiento con DNasa que se excluye de la terapia comprende, o consiste esencialmente en, o consiste aún además en, Pulmozyme®, (dornase alpha; Genentech, Inc.).

Un agente que ocluye superficies críticas que son necesarias para la persistencia intercelular, interfiere o impide la unión del ADN microbiano a la proteína o polipéptido DNABII incluyen:

(a) un polipéptido del factor huésped de integración (IHF) aislado o recombinante o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(b) una proteína o polipéptido aislado o recombinante identificado en la Tabla 1, Tabla 2, el fragmento de Arm identificado en la Tabla 2, Tabla 3 o un péptido de unión a ADN identificado en la Figura 9, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(c) un polipéptido aislado o recombinante de la SEQ ID NO. 1 a 33 o un equivalente del mismo, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(d) un polipéptido c-terminal aislado o recombinante de la SEQ ID NO. 5 hasta 11, 28, 29 o los identificados en la Tabla 1, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(e) un polipéptido que compite con u ocluye superficies críticas sin desplazamiento o un factor huésped de integración al unirse a un ADN microbiano;

- (f) un polinucleótido de unión de cuatro vías que se asemeja a una unión de Holliday, un polinucleótido de unión de 3 vías que se asemeja a una horquilla de replicación, un polinucleótido que tiene flexibilidad inherente o polinucleótido doblado;
- (g) un polinucleótido aislado o recombinante que codifica uno cualquiera de (a) hasta (e);
- 5 (h) un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno que reconoce o se une específicamente a uno cualquiera de (a) hasta (e), o un equivalente o fragmento de cada uno de los mismos;
- (i) un polinucleótido aislado o recombinante que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de (h); y
- (j) una molécula pequeña que compite con la unión de una proteína o polipéptido de ADN BII a un ADN microbiano.
- 10 Un polipéptido aislado o recombinante que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO. 1 a 5 o 12 a 27 o 30 a 33, o se describe un péptido de unión a ADN identificado en la Figura 9.
- Los procedimientos se llevan a cabo con un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste aún además en la SEQ ID NO. 1 o 2, con la condición de que el polipéptido no sea ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11, 28 o 29.
- 15 Los procedimientos se llevan a cabo con un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste aún además en la SEQ ID NO. 3, 4 o 5, con la condición de que el polipéptido no sea ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11, 28 o 29.
- Los procedimientos se llevan a cabo con un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste aún además en la SEQ ID NO. 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30 o 32, con la condición de que el polipéptido no sea ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11, 28 o 29.
- 20 Los procedimientos se realizan con un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente en, o que consiste aún además en la SEQ ID NO. 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 31 o 33, con la condición de que el polipéptido no sea ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11, 28 o 29.
- 25 Los procedimientos se llevan a cabo con un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste aún además en la SEQ ID NO. 12 y 13 o 14 y 15 o 16 y 17 o 18 y 19 o 20 y 21 o 22 y 23 o 24 y 25, o 26 y 27 o 30 y 31 o 32 y 33, con la condición de que el polipéptido no sea ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11, 28 o 29.
- Los procedimientos se realizan con un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste aún además en la región c-terminal o péptido del polipéptido del grupo de un polipéptido de ADN BII, un polipéptido IHF, SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29 o los identificados en la Tabla 1, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos.
- 30 Los ejemplos no limitantes adicionales de agentes que se pueden usar en los procedimientos descritos incluyen:
- (a) un polipéptido del factor huésped de integración aislado o recombinante (IHF) o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;
- 35 (b) una proteína de tipo histona aislada o recombinante del polipéptido de la cepa U93 (HU) de *E. coli* o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;
- (c) una proteína o polipéptido aislado o recombinante identificado en la Tabla 1, Tabla 2, el fragmento de Arm identificado en la Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4 o un péptido de unión a ADN identificado en la FIG. 9, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;
- 40 (d) un polipéptido aislado o recombinante de la SEQ ID NO. 1 a 348, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;
- (e) un polipéptido C-terminal aislado o recombinante de la SEQ ID NO. 6 hasta 11, 28, 29, 42 a 100, la Tabla 1 o aquellos polipéptidos C-terminales identificados en la Tabla 4 o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;
- 45 (f) un polipéptido o polinucleótido que compite con un factor huésped de integración en la unión a un ADN microbiano;
- (g) un polinucleótido de unión de cuatro vías que se asemeja a una unión de Holliday, un polinucleótido de unión de 3 vías que se asemeja a una horquilla de replicación, un polinucleótido que tiene flexibilidad inherente o polinucleótido doblado;

- (h) un polinucleótido aislado o recombinante que codifica uno cualquiera de (a) hasta (f) o un polinucleótido aislado o recombinante de la SEQ NO. 36 o un equivalente de cada uno de los mismos, o un polinucleótido que hibrida bajo condiciones restrictivas con el polinucleótido, su equivalente o su complemento;
- 5 (i) un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno que reconoce o se une específicamente a cualquiera de (a) hasta (f), o un equivalente o fragmento de cada anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo;
- (j) un polinucleótido aislado o recombinante que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de (i) o su complemento; o
- (k) una molécula pequeña que compite con u ocluye la unión de una proteína o polipéptido DNABII a un ADN microbiano.
- 10 También se describe en el presente documento un procedimiento para inducir una respuesta inmune o conferir inmunidad pasiva en un sujeto con CF que lo necesita, que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente o que consiste aún además en administrar al sujeto con CF una cantidad efectiva de uno o más agentes del grupo:
- 15 (a) un polipéptido del factor huésped de integración aislado o recombinante (IHF), o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;
- (b) una proteína de tipo histona aislada o recombinante del polipéptido de la cepa U93 (HU) de *E. coli* o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;
- 20 (c) un polipéptido de proteína aislado o recombinante identificado en la Tabla 1, Tabla 2, el fragmento de Arm identificado en la Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4, o un péptido de unión a ADN identificado en la Figura 9, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;
- (d) un polipéptido aislado o recombinante de la SEQ ID NO. 1 a 348, o un fragmento o un equivalente del mismo;
- 25 (e) un polipéptido C-terminal aislado o recombinante de la SEQ ID NO. 6 hasta 11, 28, 29, 42 a 100, la Tabla 1 o aquellos polipéptidos C-terminales identificados en la Tabla 4 o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;
- 30 (f) un polinucleótido aislado o recombinante que codifica cualquiera de (a) hasta (e) o un polinucleótido aislado o recombinante de la SEQ ID NO. 36 o un equivalente de cada uno de los mismos, o un polinucleótido que hibrida bajo condiciones restrictivas con el polinucleótido, su equivalente o su complemento;
- (g) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce o se une específicamente a cualquiera de (a) hasta (e), o un equivalente o fragmento de cada uno de los mismos;
- 35 (h) un polinucleótido aislado o recombinante que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de (g);
- (i) una célula presentadora de antígeno pulsada con uno cualquiera de (a) hasta (e); y
- (j) una célula presentadora de antígeno transfectada con uno o más polinucleótidos que codifican uno cualquiera de (a) hasta (e).
- 35 Los sujetos que necesitan tal respuesta o apoyo inmunitario incluyen aquellos en riesgo de padecer o que padecen una infección que produce una biopelícula microbiana.
- También se describen en el presente documento polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y composiciones para usar en los procedimientos anteriores, cuyos ejemplos no limitantes se analizan a continuación.
- 40 Se describe un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente en, una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO. 1 a 5 o 12 a 27, 30 a 35, 101-348 o un péptido de unión a ADN identificado en la FIG. 9.
- Se describe un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente en, o aún además que consiste en la SEQ ID NO. 1 o 2, con la condición de que el polipéptido no sea ninguno de la
- 45 SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29 o a 100.
- Se describe un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente en, o aún además que consiste en la SEQ ID NO. 3, 4 o 5, con la condición de que el polipéptido no sea ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29 o 42 a 100.

ES 2 746 971 T3

Se describe un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente en, o aún además, que consiste en la SEQ ID NO. 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30 o 32, con la condición de que el polipéptido no pertenezca a la SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29 o 42 a 100.

5 Se describe un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente en, o aún además que consiste en la SEQ ID NO. 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 31 o 33, con la condición de que el polipéptido no pertenezca a la SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29 o 42 a 100.

Se describe un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente en, o aún además que consiste en la SEQ ID NO. 337, 338, 339 o 340, con la condición de que el polipéptido no sea ninguno de la SEQ ID NO, 6 a 11, 28, 29 o 42 a 100.

10 Se describe un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente en, o aún además, que consta de la SEQ ID NO. 12 y 13 o 14 y 15 o 16 y 17 o 18 y 19 o 20 y 21 o 22 y 23 o 24 y 25, o 26 y 27 o 30 y 31 o 32 y 33, con la condición de que el polipéptido no sea ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29 o 42 a 100.

15 Se describe un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente en, o aún además que consiste en, la región C-terminal que contiene al menos 10, o alternativamente al menos 15, o alternativamente al menos 20, o alternativamente al menos 25, o alternativamente al menos 30, aminoácidos C-terminales de un polipéptido del grupo de un polipéptido DNABII, un polipéptido IHF, un polipéptido HU, SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29 o aquellos identificados en la Tabla 1, Tabla 2, el fragmento de Arm identificado en la Tabla 2, Tabla 4 o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos, o un polipéptido de las SEQ ID NOS.: 337 a 340, o un equivalente del mismo.

20

Se describe un polipéptido o polinucleótido aislado o recombinante del grupo de:

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 12 y 13;

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 14 y 15;

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 16 y 17;

25 un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 18 y 19;

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 20 y 21;

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 23 y 24;

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 25 y 26;

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 30 y 31;

30 un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 32 y 33;

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 34 y 35;

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 337 y 338; o

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 339 y 340;

un polinucleótido o polipéptido que comprende la SEQ ID NOS. 341 a 348;

35 con la condición de que el polipéptido no sea de tipo silvestre de uno cualquiera de IHF alfa, IHF beta o la SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29 o 42 a 100.

Se describe un polinucleótido o polipéptido aislado o recombinante del grupo de:

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 12 y 13;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 14 y 15;

40 un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 16 y 17;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 18 y 19;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 20 y 21;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 23 y 24;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 25 y 26;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 30 y 31;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 32 y 33;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 34 y 35;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 337 y 338; o

5 un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 339 y 340;

un polinucleótido o polipéptido que consiste esencialmente en uno cualquiera de la SEQ ID NOS. 341 a 348;

con la condición de que el polipéptido no sea de tipo silvestre de cualquiera de IHF alfa, IHF beta o SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29 o 42 a 100.

10 También se describen polipéptidos aislados o recombinantes que comprenden, o que consisten alternativamente esencialmente o aún además, consisten en dos o más, o tres o más o cuatro o más, o múltiplos de los polipéptidos aislados identificados anteriormente, incluidos fragmentos y equivalentes de los mismos. Ejemplos de tales incluyen polipéptidos aislados que comprenden la SEQ ID NO. 1 a 4 y/o 12 a 29, y/o 30 a 33, y/o 30 a 35, por ejemplo, SEQ ID NO. 1 y 2, o alternativamente 1 y 3 o alternativamente 1 y 4, o alternativamente 2 y 3, o alternativamente SEQ ID NO. 1, 2 y 3 o alternativamente, 2, 3 y 4, o alternativamente 1, 3 y 4 o polipéptidos equivalentes, ejemplos de los cuales se muestran en la Tabla 2 y específicamente el fragmento Arm identificado en la Tabla 2 o un equivalente de los mismos, o un polipéptido de las SEQ ID NOS: 337 a 340, o un equivalente de los mismos. Los polipéptidos pueden estar en cualquier orientación, por ejemplo, SEQ ID NO. 1, 2 y 3 o SEQ ID NO. 3, 2 y 1 o alternativamente SEQ ID NO. 2, 1 y 3, o alternativamente, 3, 1 y 2, o alternativamente 11 y 12, o alternativamente 1 y 12, o alternativamente 2 y 12, o alternativamente, 1 y 12, o alternativamente 2 y 13, o alternativamente 12, 16 y 1, o alternativamente 1, 16 y 12.

Se describe un polipéptido aislado o recombinante que comprende la SEQ ID NO. 1 o 2 y 3 o 4 o un polipéptido o polipéptido recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste además en un aminoácido que corresponde a fragmentos de una proteína DNABII tales como los fragmentos β -3 y/o α -3 de un microorganismo de *Haemophilus influenzae* IHF- α o IHF.beta., cuyos ejemplos no limitantes incluyen la SEQ ID NO. 12 a 27, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los polipéptidos, cuyos ejemplos se muestran en las Tablas 2 y 3. Los polipéptidos de tipo silvestre aislados están específicamente excluidos, p. que el polipéptido no es ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11 o una secuencia de tipo silvestre identificada en la Tabla 1. En este caso, la SEQ ID NO. 1 o 2 o un polipéptido que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente en, o que consiste además en un aminoácido correspondiente a los fragmentos β -3 y/o α -3 de un microorganismo alfa IHF. o IHF.beta., cuyos ejemplos no limitativos incluyen la SEQ ID NO. 12 a 27 y 30 a 33 o un equivalente de cada uno de los mismos se encuentra corriente arriba o en el terminal amino de la SEQ ID NO. 3 o 4 o un fragmento o un equivalente del mismo. El polipéptido aislado comprende la SEQ ID NO. 3 o 4 o un polipéptido que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente en, o que consiste aún además en un aminoácido correspondiente a los fragmentos β -3 y/o α -3 de un microorganismo α IHF. o IHF.beta., cuyos ejemplos no limitantes incluyen la SEQ ID NO. 12 a 27, o un equivalente del mismo ubicado corriente arriba o terminal amino a la SEQ ID. NO. 1 o 2 o un equivalente de los mismos.

Se puede agregar un enlazador peptídico al N-terminal o al C-terminal del polipéptido, fragmento o equivalente del mismo. El enlazador se une a los polipéptidos, por ejemplo, SEQ ID NO. 1 a 4, 28, 29, 34 o 35 o 30 a 33, 34 o 35 o un polipéptido que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste aún además en un aminoácido correspondiente a los fragmentos de β -3 y/o .alpha.-3 de un microorganismo *Haemophilus influenzae* IHF.alpha. o IHF.beta., cuyos ejemplos no limitativos incluyen la SEQ ID NO. 12 a 27 o un equivalente de cada uno de los mismos. Un "enlazador" o "enlazador peptídico" se refiere a una secuencia peptídica unida bien sea al N-terminal o al C-terminal de una secuencia polipeptídica. En un aspecto, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 residuos de aminoácidos o, alternativamente, de 2 a aproximadamente 10, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 residuos de aminoácidos de longitud. Un ejemplo de un enlazador peptídico es Gly-Pro-Ser-Leu-Lys-Leu (SEQ ID NO: 37).

Se describe adicionalmente un fragmento o un equivalente del polipéptido aislado o recombinante de cualquiera de los polipéptidos identificados anteriormente, así como un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste además, de dos o más de los polipéptidos aislados o recombinantes identificados anteriormente.

Aún además se describe un polinucleótido que interfiere con la unión del ADN microbiano con un polipéptido o fragmento o equivalente del mismo, por ejemplo, SEQ ID 36, o un polinucleótido de unión de cuatro vías que se asemeja a una unión de Holliday, un polinucleótido de unión de 3 vías que se asemeja a una replicación fork, un polinucleótido que tiene flexibilidad inherente o polinucleótido doblado; un polinucleótido aislado o recombinante que codifica un polipéptido descrito anteriormente o un anticuerpo o fragmento del mismo, el cual puede enlazarse

operativamente a elementos reguladores necesarios para la expresión y/o replicación del polinucleótido. El polinucleótido puede estar contenido dentro de un vector.

5 También se describe una célula huésped aislada que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste aún además en un polipéptido aislado o recombinante descrito anteriormente, un polinucleótido de unión de cuatro vías que se asemeja a una unión de Holliday, un polinucleótido de unión de 3 vías que se asemeja a una horquilla de replicación, un polinucleótido que tiene flexibilidad inherente o polinucleótido doblado; un polinucleótido aislado o recombinante como se describe anteriormente, o un vector como se describe anteriormente.

10 Se describe adicionalmente un fragmento o un equivalente del polipéptido aislado o recombinante de cualquiera de los polipéptidos identificados anteriormente, así como un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste aún además, de dos o más de los aislados o polipéptidos recombinantes identificados anteriormente.

15 Los procedimientos se realizan con un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que reconoce y se une específicamente al polipéptido aislado o recombinante como se describió anteriormente, incluido un fragmento o un equivalente del polipéptido. Ejemplos no limitantes de anticuerpos incluyen un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un derivado de anticuerpo, un anticuerpo recubierto, un diacuerpo, un anticuerpo quimérico, un derivado de anticuerpo, un anticuerpo humano recombinante o un anticuerpo fragmento. En un aspecto particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Aún además se proporciona una línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal.

20 Los anticuerpos, polinucleótidos, polipéptidos, vectores o células huésped pueden comprender además un marcador detectable o un vehículo, tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 También se proporcionan composiciones que comprenden un vehículo y uno o más de un péptido aislado o recombinante de la invención, un nucleótido aislado o recombinante de la invención, un vector de la invención, una célula huésped aislada de la invención o un anticuerpo de la invención. Los portadores pueden ser uno o más de un soporte sólido, un dispositivo médico como una cánula, o implante dental, o un líquido tal como un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden comprender además un adyuvante, un péptido antimicrobiano o antigénico.

30 Las composiciones pueden comprender además agentes biológicamente activos adicionales. Un ejemplo no limitativo de estos es un agente antimicrobiano tal como otros componentes de la vacuna (es decir, péptidos antigénicos) tal como los antígenos de superficie, por ejemplo una proteína Pilin tipo IV (véase Jurcisek y Bakaletz (2007) J. of Bacteriology 189 (10): 3868-3875).

Se describe un procedimiento para producir un péptido antigénico haciendo crecer o cultivando una célula huésped que comprende un polinucleótido aislado como se describe anteriormente bajo condiciones que favorecen la expresión del polinucleótido. El polipéptido producido por este procedimiento puede aislarse para uso adicional *in vitro* o *in vivo*.

35 También se describe un kit para uso diagnóstico o terapéutico que comprende una composición como se describió anteriormente e instrucciones de uso. También se describe un kit para realizar pruebas de cribado de nuevos fármacos y/o terapias combinadas, según se establece en este documento.

Listado de secuencias

SEQ. ID NO. 1

40 A1-A2-A3-A4-A5-A6-A7-A8-A9

en la que:

A1 es V o I;

A2 es uno cualquiera de K, Q, E, A, V o Y;

A3 es uno cualquiera de K, L, I, V o F;

45 A4 es uno cualquiera de S, I, R o V;

A5 es uno cualquiera de G o S;

A6 es F;

A7 es G;

A8 es uno cualquiera de N o S o T o K; y

A9 es F.

SEQ. ID NO. 2 es VKKSGFGNF

SEQ ID NO. 3 es B1-B2-B3-B4-B5-B6-B7

en la que :

- 5 B1 está ausente o uno cualquiera de G o K;
 B2 está ausente o uno cualquiera de R, I o K;
 B3 es N o V;
 B4 es P o I;
 B5 es uno cualquiera de K, Q, S o G;
 10 B6 es uno cualquiera de T, K o S; y
 B7 es uno cualquiera de G, K, Q o D.

SEQ. ID NO. 4 es NP(K/Q)TG

SEQ. ID NO. 5 GRNP(K/Q)TG

- 15 SEQ. ID NO. 6 tipo silvestre de longitud completa (wt) 86-028NP *Haemophilus influenzae IhfA*; Genbank acceso No.: AAX88425.1, último acceso mazo 21, 2011:

MATITKLDIIEYLSDKYHLSK

QDTKNVVENFLEEIRLSLESGQDVKLSGFGNFELRDKSSRPGRNPKTGDVVPVSARR

VVTFKPGQKLRARVEKTK

- 20 SEQ. ID NO. 7 longitud completa wt 86-028NP *Haemophilus influenzae*HU, Genbank acceso No.: YP_248142.1, último acceso Marzo 21, 2011: MRFVTIFINHAFNSSQVRLSFAQFLR QIRKDTFKESNFLFNRRYKFMNKTDLIDAIANAELNKKQAKAALEATLDAITASLK
 EGEPVQLIGFGTFKVNARAARTGRNPQTGAIEIQIAASKVPAFVSGKALKDAIK

SEQ. ID NO. 8 longitud completa wt R2846 *Haemophilus influenzaeIhfA*, Genbank acceso No.: ADO96375, último acceso Marzo 21, 2011:

MATITKLDIIEYLSDKYHLSKQDTKNVVENFL

EEIRLSLESGQDVKLSGFGNFELRDKSSRPGRNPKTGDVVPVSARRVVTFKPGQKLR

ARVEKTK

- 25 SDQ. ID NO. 9 longitud completa wt Rd *Haemophilus influenzae IhfA*; Genbank acceso No.: AAC22959.1, último acceso Marzo 21, 2011: MATITKLDIIEYLSDKYHLSKQDTK NVVENFLEEIRLSLESGQDVKLSGFGNFELRDKSSRPGRNPKTGDVVPVSARRVTF KPGQKLRARVEKTK;

- 30 SEQ. ID NO. 10 longitud completa wt *E. coli* K12 *IhfA*; Genbank acceso No.: AAC74782.1, último acceso Marzo 21, 2011: MALTKAEMSEYLFDKLGLSKRDAKELVELFFE EIRRALENGEQVKLSGFGNFDLRDKNQRPRNPKTGEDIPITARRVVT FRPGQKLSRVENASPKDE; DNA Genbank No. NC_000913

- 35 SEQ. ID NO. 11 longitud completa wt *P. aeruginosa* PA 01 *IhfA*; Genbank acceso No.: AAG06126.1, último acceso Marzo 21, 2011: MGALTKAEIAERLYEELGLNKREA KELVELFFEEIRQALEHNEQVKLSGFGNFDLRDQRPRNPKTGEEIPITARRVVTF
 RPGQKLRARVEAYAGTKS

SEQ. ID NOS. 12 y 13: porciones β -3 y α -3 de (IHF β) SEQ ID NO. 12: TFRPGQ y

SEQ ID NO. 13: KLKSRVENASPKDE

SEQ ID NOS. 14 y 15: porciones β -3 y α -3 de (IHF β) SEQ ID NO. 14: HFKPGK y SEQ ID NO. 15: ELRDRANIYG

- SEQ ID NOS. 16 y 17: porciones β -3 y α -3 de SEQ ID NOS. 6, SEQ ID NOS. 16: TFKPGQ y SEQ ID NO. 17: KLRARVEKTK
- SEQ ID NOS. 18 y 19: porciones β -3 y α -3 de 2019 *Haemophilus influenzae* *IhfA*, SEQ ID NO. 18: TFKPGQ y SEQ ID NO. 19: KLRARVENTK
- 5 SEQ ID NOS. 20 y 21: porciones β -3 y α -3 de SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 20: TFKPGQ y SEQ ID NO. 21: KLRARVEKTK
- SEQ ID NOS. 22 y 23: porciones β -3 y α -3 de SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 22: TFKPGQ y SEQ ID NO. 23: KLRARVEKTK
- 10 SEQ ID NOS. 24 y 25: porciones β -3 y α -3 de SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 24: TFRPGQ y SEQ ID NO. 25: KLKSRVENASPKDE
- SEQ ID NOS. 26 y 27: porciones β -3 y α -3 de SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 26: TFRPGQ y SEQ ID NO. 27: KLKARVEAYAGTKS
- 15 SEQ ID NO. 28: *E. coli hupA*, Genbank acceso No.: AP_003818, último acceso Marzo 21, 2011: MNKTQLIDVIAEKAELSKTQAKAALESTLAAITESLKEGDAVQLVGFQTFK
VNHRARTGRNPQTGKEIKIAAANVPFVSGKALKDAVK
- SEQ ID NO. 29: *E. coli hupB*, Genbank acceso No.: AP_001090.1, último acceso Marzo 21, 2011: MNKSQLIDKIAAGADISKAAAGRALDAIIASVTESLKEGDDVALVGFQ
TFAVKERAARTGRNPQTGKEITIAAAKVPFVSGKALKDAVN
- 20 SEQ ID NOS. 30 y 31: porciones β -3 y α -3 de SEQ ID NO. 28, SEQ ID NO. 30: AFVSGK y SEQ ID NO. 31: ALKDAVK
- SEQ ID NOS. 32 y 33: porciones β -3 y α -3 de SEQ ID NO. 29, SEQ ID NO. 32: SFRAGK y SEQ ID NO. 33: ALKDAVN
- SEQ. ID NO. 34: 20 aminoácidos C-terminales de IHF α : TFRPGQKLKSRVENASPKDE
- SEQ. ID NO. 35: 20 aminoácidos C-terminales de IHF β : KYVPHFKPGKELDRANIYG
- 25 SEQ. ID NO. 36: secuencia de consenso de unión a DNABII: WATCAANNNTTR en la que W es A o T, N es cualquier base y R es una purina
- SEQ. ID NO. 337: *E. coli IHF* α : GRNPKTGEDIP
- SEQ. ID NO. 338: *E. coli IHF* β : GRNPKTGDKVEL
- SEQ. ID NO. 339: *E. coli HU* α : GRNPQTGKEIKI
- 30 SEQ. ID NO. 340: *E. coli HU* β : GRNPQTGKEITI

Descripción de tablas

La Tabla 1 es un resumen no limitado de proteínas de unión a ADN producidas por bacterias gram(+) y gram(-) que pueden usarse en los procedimientos proporcionados aquí.

- 35 La Tabla 2 es una alineación de secuencia de porciones relevantes de las proteínas de unión al ADN de diversas realizaciones de esta invención. Las letras en negrita indican una coincidencia exacta con el consenso, las letras en gris claro indican un cambio conservador de aminoácidos, y las secuencias con sombras claras u oscuras están altamente conservadas entre las especies. Las secuencias indefinidas sombreadas en gris en el terminal amino y/o carboxi son aminoácidos indefinidos que no comparten secuencias de consenso. La tabla 2 se basa en información publicada previamente en Obeto et al. (1994) *Biochimie* 76: 901-908. El fragmento "ARM" se denota en la parte inferior de la tabla y el fragmento de polipéptido que comprende, o que consiste esencialmente en, o que consiste aún además en estos fragmentos o sus equivalentes tiene actividad biológica como se indica en este documento.
- 40

La Tabla 3 es una comparación del motivo del péptido de 16 aminoácidos con Liu et al. (2008) *Cell Microbiol.* 10 (1): 262-276.

La Tabla 4 es una lista de porciones α , β y C-terminales de proteínas DNABII del organismo indicado.

- 45 **Breve descripción de los dibujos**

Las **Figuras 1A-1C** muestran la presencia tanto de ADNc como de IHF dentro de una biopelícula formada por *B. cenocepacia*. **Figura 1A** – Biopelícula de veinticuatro horas sin fijar formada por *B. cenocepacia* teñida con FilmTracer FM 1-43. **Figura 1B** – biopelícula de 24 horas sin fijar formada por *B. cenocepacia* e inmunomarcada con antisuero monoclonal dirigido contra ADNc (color blanco en la imagen). **Figura 1C** - biopelícula de 24 horas sin fijar formada por *B. cenocepacia* marcada con antisuero dirigido contra ADNc y suero de conejo anti-IHF para mostrar la presencia de IHF así como de ADNc (color blanco) dentro de la biopelícula. Obsérvese la biopelícula robusta formada por *B. cenocepacia* en la Figura 1A. La presencia de ADNc que es particularmente densa en el fondo de la biopelícula se puede ver en la Figura 1B. La biopelícula de 24 horas formada por *B. cenocepacia* también es rica en IHF como se muestra por la abundancia en la Figura 1C. Todas las imágenes capturadas con un objetivo 63X.

La **Figura 2** muestra el etiquetado de IHF y ADNc dentro del esputo recolectado de un paciente con CF positivo para cultivo de *B. cenocepacia*. La micrografía ligera inmunomarcada demuestra un marcador pesado tanto del ADNc (cadenas blancas) como de la proteína DNABII IHF (marcado puntiforme; véanse flechas) dentro de una muestra de esputo recuperada de un paciente con CF infectado con *B. cenocepacia*. Como se mostró anteriormente con biopelículas no tipificables formadas por *Haemophilus influenzae*, en las formadas por *B. cenocepacia*, uniones donde las cadenas de ADNc bacteriano cruzan etiquetas marcadamente por la presencia de IHF, lo que sugiere su papel en el mantenimiento del andamiaje estructural de estas biopelículas. La barra de escala es igual a 5 μ m.

Las **Figuras 3A-3H** muestran la interrupción de las biopelículas de *B. cenocepacia* preformadas por incubación con antisuero dirigido contra IHF. Biopelículas de *B. cenocepacia* después de 24 h. de crecimiento en un portaobjetos de cámara, luego tratadas durante 16 horas con: **Figura 3A**- medio estéril **Figura 3B** - suero de conejo inalterado. **Figura 3C** - Antisuero de conejo dirigido contra IHF aislado. **Figura 3D** - anti-IHF enriquecido con IgG. **Figura 3E** - Efluente de suero de la columna de enriquecimiento. La **Figura 3F** –transferencia Western que muestra el reconocimiento de anticuerpos dirigidos contra IHF, así como anti-IHF enriquecido con IgG para IHF e IHF purificados dentro de lisado de células enteras de *B. cenocepacia*. Las flechas indican el reconocimiento de la forma de monómero de IHF en cada transferencia. Además, cada fracción de suero reconoció las formas di- y triméricas de IHF dentro de los lisados de células enteras de cepas K56-2 de *B. cenocepacia*. **Figura 3G**: gráfico de los cambios en el espesor promedio de la biopelícula \pm SEM después de cada uno de los tratamientos indicados. **Figura 3H** - gráfico de cambios en la biomasa de biopelícula \pm SEM después de cada uno de los tratamientos indicados. Nótese que la interrupción estadísticamente significativa de las biopelículas de *B. cenocepacia* preformadas está mediada solo por suero anti-IHF de conejo, así como una fracción de ese suero que se enriqueció para IgG en comparación con el tratamiento con medio estéril, suero de conejo inalterado o efluente de suero de columna de enriquecimiento de IgG. Los asteriscos indican significancia estadística ($p < 0,05$) en comparación con el medio estéril, suero inalterado y efluente de columna de enriquecimiento.

Las **Figuras 4A-4N** muestran una demostración del comportamiento sinérgico de los anticuerpos dirigidos contra IHF en combinación con antimicrobianos o antibióticos. **Figuras 4A-4C**: una biopelícula de *B. cenocepacia* no tratada. **Figuras 4D-4F**- una biopelícula de *B. cenocepacia* después del tratamiento con una dilución 1:50 de anti-IHF. **Figuras 4G-4I**: una biopelícula de *B. cenocepacia* después del tratamiento con la MIC de ceftazidima (16 μ g/ml). **Figuras 4J-4L**: una biopelícula de *B. cenocepacia* después del tratamiento con una combinación de anti-IHF más ceftazidima en la MIC indicada. Obsérvese la marcada reducción de la altura de la biopelícula y el aumento notable de la destrucción de *B. cenocepacia* cuando se trata tanto con anti-IHF como con ceftazidima en comparación con el tratamiento con antibiótico solo (indicado en la segunda fila de imágenes; compare los paneles H y K). **Figura 4M**- espesor promedio de biopelículas después del tratamiento con antibiótico o antibiótico más anti-IHF \pm SEM. **Figura 4N** - biomasa de biopelícula después de la incubación con antibiótico o antibiótico más anti-IHF \pm SEM. Los asteriscos indican significancia estadística entre pares designados ($p < 0,05$). Obsérvese una reducción significativa tanto en el espesor promedio de la biopelícula como en la biomasa mediada por una combinación de suero anti-IHF más ceftazidima, ciprofloxacina, imipenem y minociclina.

Las **Figuras 5A-5E** muestran la inducción de una biopelícula de *B. cenocepacia* más robusta después de la exposición a Pulmozyme (DNasa). **Figura 5A** - tratamiento de una biopelícula de *B. cenocepacia* de 24 horas con diluyente salino solo. **Figura 5B** – el tratamiento de una biopelícula de *B. cenocepacia* de 24 horas con Pulmozyme (DNasa) indujo la formación de una biopelícula notablemente más densa y espesa que la tratada solo con diluyente salino (compárense los paneles A y B). **Figura 5C**: tratamiento de una biopelícula de *B. cenocepacia* de 24 horas con Pulmozyme y anti-IHF. Las biopelículas se tiñeron para determinar su viabilidad y seudocoloraron blanco (células vivas) y oscuro (células muertas) y demostraron una muerte bacteriana mínima con cualquier tratamiento. El espesor medio relativo de la biopelícula \pm SD y la biomasa \pm SEM se representan gráficamente en las **Figuras 5D y 5E**. El asterisco indica una biopelícula significativamente más gruesa después de la exposición a Pulmozyme en comparación con el tratamiento con diluyente salino ($p < 0,05$).

La **Figura 6** muestra que el pretratamiento de *B. cenocepacia* con anti-IHF indujo una supervivencia significativamente reducida en macrófagos de CF murina. Se detectaron significativamente menos *B.*

cenocarpia 6 horas después del pretratamiento de la bacteria con anti-IHF en comparación con suero inalterado (* $p < 0,05$). También se muestran las UFC/ml bacterianas para cada punto de tiempo \pm SD.

Las Figuras 7A-7E muestran la expresión de una biopelícula robusta de *B. cenocarpia* que incorpora IHF dependía de un T6SS activo. **Figura 7A** – biopelícula formado por el aislado parental (cepa K56-2 de *B. cenocarpia*). **Figura 7B** - biopelícula formada por el mutante del sistema de secreción tipo III (cepa JRL2) teñida con yoduro de propidio. **Figura 7C** - biopelícula formada por el mutante del sistema de secreción tipo VI (cepa DFA2) teñida con yoduro de propidio. Todas las biopelículas fueron marcadas por la presencia de una proteína DNABII (IHF). Mientras que las biopelículas formadas por cualquiera de los mutantes del sistema de secreción eran notablemente menos robustas que las formadas por el aislamiento parental, observe una marcada reducción en el etiquetado de la biopelícula formada por el mutante T6SS (véase Figura 7C), lo que sugiere que el mutante T6SS estaba comprometido en su capacidad para incorporar IHF en biopelículas formadas bajo estas condiciones. **Figura 7D** - IHF se unió a la huella de DNasa del espacio intergénico (386 pb) entre BCAL0339 y BCAL0340, parte de la aglomeración de genes T6SS para *B. cenocarpia*. La huella de IHF cubre la región de 25 pb a 52 pb corriente arriba del codón de inicio BACL0340, mientras que se encontró un promotor putativo de 75 pb a 104 pb corriente arriba del codón de inicio (**Figura 7E**). HSS: sitio hipersensible indicativo del doblado de ADN. Esta observación sugirió que IHF podría autorregular su propia liberación, así como quizás la del ADN que se incorpora a la matriz de biopelícula.

Las Figuras 8A-8F muestran la demostración del contenido relativo de ADN de las biopelículas formadas en portaobjetos de cámara por el aislado parental K56-2, su mutante T3SS o su mutante T6SS. Las biopelículas formadas por la cepa parental de *B. cenocarpia* o sus mutantes T3SS y T6SS seguidas de tinción con FilmTracer FM 1-43 se pueden ver en las Figs. 8A, 8C y 8E, respectivamente. El contenido relativo de ADN de cada biopelícula no fijada puede determinarse mediante inmunomarcaje de cada biopelícula con un anticuerpo monoclonal dirigido contra ADNbc como en las Figs. 8B, 8D y 8F.

La **Figura 9A** es un mapa que indica los residuos de aminoácidos de IHF que interactúan o se unen a otro IHF en un atenuador IHF-IHF (indicado por triángulos en el nivel superior) o interactúan o se unen al ADN (indicado por triángulos en el nivel inferior). El péptido se divide por las barras verticales cortas en regiones que contienen 3 aminoácidos. La **Figura 9B** representa gráficamente la interacción del ADN microbiano con un IHF.

Las Figuras 10A-10B muestran la perturbación de las biopelículas de NTHI por anti-IHF_{*E. coli*}. **(A)** Imágenes representativas de biopelículas de NTHI y **(B)** biomasa media calculada. un medio de; b, suero inalterado; c, anti-IHF_{*E. coli*}. Anti-IHF_{*E. coli*} interrumpió significativamente las biopelículas de NTHI establecidas durante 16 horas a 2 semanas, en comparación con suero o medio inalterado. Los datos se expresan como la media \pm SEM de tres ensayos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ en comparación con el tratamiento de suero inalterado respectivo, ANOVA unidireccional.

Las Figuras 11A-11C muestra la cinética de la perturbación de la biopelícula por anti-IHF_{*E. coli*}. **(A)** Imágenes representativas de biopelículas de NTHI y **(B)** biomasa media calculada. un medio de; b, suero inalterado; c, anti-IHF_{*E. coli*}. La reducción en biomasa mediada por anti-IHF_{*E. coli*} fue máxima a las 6 h y sostenida durante 24 h. **(C)** Biopelículas de 24 horas tratada con medio, una dilución 1:5 de suero inalterado o anti-IHF_{*E. coli*}. El tratamiento con mayor concentración de anti-IHF_{*E. coli*} erradicó la biopelícula, dejando una monocapa de bacterias. Los datos se expresan como la media \pm SEM de tres ensayos independientes. * $p < 0,01$ en comparación con el tratamiento de suero inalterado respectivo, ANOVA unidireccional.

Las Figuras 12A-12F muestran ese contacto directo entre anti-IHF_{*E. coli*} y la biopelícula no fue necesaria para mediar la perturbación. **(A)** Imágenes representativas de biopelículas tratadas basolateralmente con medio o suero. **(B-C)** Biopelículas tratadas apicalmente mediante la colocación de anticuerpos acoplados a perlas de agarosa en un transpocillo, **(D)** biopelículas de NTHI después de que las perlas desnudas se colocaron debajo de perlas acopladas a anticuerpos apicalmente, **(E)** biopelículas después de mezclar perlas desnudas y acopladas a anticuerpos. **(F)** Valores de biomasa después de la incubación con: a, medio; b, suero inalterado; c, anti-IHF_{*E. coli*} d, suero inalterado enriquecido con IgG acoplado; e, anti-IHF_{*E. coli*} enriquecido con IgG acoplado; f, perlas desnudas en capas bajo suero inalterado enriquecido con IgG acoplado; g, perlas desnudas en capas bajo anti-IHF_{*E. coli*} enriquecido con IgG acoplado; h, suero inalterado desnudo mixto y acoplado enriquecido con IgG; i, anti-IHF_{*E. coli*} desnudo mixto y acoplado enriquecido con IgG. Los datos se expresan como la media \pm SEM de tres ensayos independientes. * $p < 0,05$ en comparación con el suero inalterado respectivo o el suero inalterado enriquecido con IgG conjugado con el tratamiento con perlas de agarosa, ANOVA unidireccional.

Las Figuras 13A-13B muestran adsorción de anticuerpo específico de anti-IHF. **(A)** Imágenes representativas de biopelículas incubadas con suero adsorbido en IHF. **(B)** Cambios en la biomasa de biopelículas y grosor medio, a, suero inalterado; b, anti-IHF_{*E. coli*}. Anti-IHF_{*E. coli*} (4,4 μ g) adsorbido con: c, 0 μ g de IHF_{*E. coli*} d, 2,2 μ g de IHF_{*E. coli*} e, 4,4 μ g de IHF_{*E. coli*} f, 4,4 μ g de rsPilA. La adsorción de anticuerpos específicos de IHF contrarrestó la perturbación de la biopelícula. Los datos se expresan como la media \pm

SEM de tres ensayos independientes. *p <0,05 en comparación con suero inalterado, ANOVA unidireccional.

Las Figuras **14A-14E** muestran que anti-IHF_{E. coli} actuó sinérgicamente con antibióticos. (**A-D**) Imágenes representativas de biopelículas tratadas con medio, antibiótico en el MIC₉₀ o antisuero. (**E**) Biomasa y grosor medio de las biopelículas tratadas. a, medio; b, suero inalterado; c, anti-IHF_{E. coli}. Incubación de biopelículas de NTHI con anti-IHF_{E. coli} más arquitectura de biopelícula marcadamente alterada con antibióticos, biomasa de biopelícula significativamente reducida y grosor medio y viabilidad impactada negativamente (obsérvese el color amarillo de las biopelículas) Los datos se expresan como la media ± SEM de tres ensayos independientes. Las barras indican p <0,05, ANOVA unidireccional.

Las Figuras **15A-15F** muestra que las bacterias recién liberadas de la biopelícula por tratamiento con anti-IHF_{E. coli} mostraron una mayor sensibilidad a los antibióticos. Las biopelículas se incubaron con ampicilina (**A&D**), amoxicilina-clavulanato (**B&E**) o cefdinir (**C&F**) en ausencia o presencia de una dilución 1:50 de anti-IHF_{E. coli} o suero inalterado. (**A-C**) adheente de CFU NTHI dentro de las biopelículas. (**D-F**) Suma del NTHI planctónico y adherente. a, medio solo; b, suero inalterado; c, anti-IHF_{E. coli}. Los datos se expresan como la media ± SEM de tres ensayos independientes. Las barras indican p <0,05, ANOVA unidireccional.

Las Figuras **16A-16F** muestran el mapeo de epítomos IHF_{NTHI} y el diseño de un péptido direccionado a IHF_{NTHI} mínimo. Modelo tridimensional que representa la reactividad de (**A**) anti-IHF_{E. coli} de chinchilla y (**B**) anti-IHF_{E. coli} de chinchilla complejo a ADN a péptidos sintéticos que representan IHFNTHI. Las regiones con reactividad se indican en gris, las regiones no reactivas en negro. (**C**) Modelo tridimensional de ADN unido a IHF para mostrar la oclusión de las regiones de unión a la punta. (**D**) Localización de *IhfA*-3_{NTHI} (amarillo) y *IhfA*-5_{NTHI} (verde) dentro del modelo de IHF. (**E**) Imágenes representativas y (**F**) biomasa media de biopelículas después de la incubación con suero de chinchilla. Los datos se expresan como la media ± SEM de tres ensayos independientes. Las barras indican p <0,05, ANOVA unidireccional. a, suero inalterado; b, anti-IHF_{E. coli} C, anti-IHF_{E. coli} complejo a ADN; d, anti-*IhfA*-3_{NTHI}; e, anti-*IhfA*-5_{NTHI}.

La Figura **17** muestra anti-IHFE *coli* enriquecido con IgG unido a perlas de agarosa y colocada en la cámara apical de un transpocillo no se difunde en la cámara basolateral según lo determinado por transferencia Western contra IHFE *coli* purificado. El medio de la cámara basolateral se recolectó 24 horas después del tratamiento con: a, suero inalterado agregado basolateralmente; b, anti-IHFE *coli* añadido basolateralmente; c, suero inalterado enriquecido con IgG enlazado a perlas de agarosa añadidas apicalmente; d, anti-IHFE *coli* enriquecido con IgG enlazado a perlas de agarosa añadidas apicalmente.

Las Figuras **18A-18B** muestran adsorción de anticuerpos anti-IHF. (**A**) La intensidad de la banda se redujo por incubación de anti-IHF_{E. coli} con IHF_{E. coli} purificado que se muestra por transferencia de ranura y (**B**) cuantificado por densitometría. a, suero inalterado; b, anti-IHF_{E. coli} c, anti-IHF_{E. coli} adsorbido con 0 µg de IHF_{E. coli} d, anti-IHF_{E. coli} adsorbido con 2,2 µg de IHF_{E. coli} e, anti-IHF_{E. coli} adsorbido con 4,4 µg de IHF_{E. coli} f, anti-IHF_{E. coli} adsorbido con 4,4 µg de rsPilA.

Las Figuras **19A-19C** muestran que el tratamiento con anti-IHF_{E. coli} no aumentó la sensibilidad de los cultivos planctónicos de NTHI a los antibióticos. (**A-C**) Los cultivos de caldo de NTHI se incubaron con ampicilina, amoxicilina-clavulanato o cefdinir en ausencia o presencia de anti-IHF_{E. coli} o suero inalterado. a, medio solo; b, suero inalterado; c, anti-IHF_{E. coli}. Los datos representan la media ± SEM de tres ensayos independientes. Las barras indican p <0,05, ANOVA unidireccional.

Descripción detallada

Definiciones

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención.

El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de cultivo de tejidos, inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, las cuales están dentro de la habilidad de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook and Russell eds. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; the series Ausubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology; the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) PCR 1: A Practical Approach (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) PCR 2: A Practical Approach; Harlow and Lane eds. (1999) Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney (2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5th edition; Gait ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; U.S. Patent No. 4,683,195; Hames and Higgins eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins eds. (1984) Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning; Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor

Laboratory); Makrides ed. (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer and Walker eds. (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); y Herzenberg et al. eds (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology.

5 Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluidos los rangos, son aproximaciones que varían (+) o (-) en incrementos de 1,0 o 0,1, según corresponda o, alternativamente, por una variación de +/- 15 %, o alternativamente 10 % o alternativamente 5 % o alternativamente 2 %. Debe entenderse, aunque no siempre se indica explícitamente, que todas las designaciones numéricas van precedidas por el término "aproximadamente". También debe entenderse, aunque no siempre se afirma explícitamente, que los reactivos descritos en este documento son meramente ejemplares y que sus equivalentes
10 son conocidos en la técnica.

Como se usa en la especificación y las reivindicaciones, la forma singular "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, el término "un polipéptido" incluye una pluralidad de polipéptidos, incluidas mezclas de los mismos.

15 Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" pretende significar que las composiciones y procedimientos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros. "Que consiste esencialmente en" cuando se usa para definir composiciones y procedimientos, significará excluir otros elementos de cualquier significado esencial para la combinación para el uso previsto. Por lo tanto, una composición que consista esencialmente en los elementos como se definen en el presente documento no excluiría trazas de contaminantes del aislamiento y procedimiento de purificación y vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes y similares. "Que consiste en " significará excluir más que oligoelementos de otros ingredientes y etapas sustanciales del procedimiento para administrar las composiciones de esta invención.
20

Una "biopelícula" se refiere a una capa delgada de microorganismos que se adhiere a la superficie de una estructura, que puede ser orgánica o inorgánica, junto con los polímeros tales como el ADN que secretan. Son muy resistentes a los agentes microbióticos y antimicrobianos. Viven en tejidos gingivales, dientes y restauraciones, causando caries y enfermedad periodontal, también conocida como enfermedad de la placa periodontal. También causan infecciones crónicas del oído medio. Las biopelículas también pueden formarse en la superficie de implantes dentales, cánulas, líneas de catéteres y lentes de contacto. Crecen en marcapasos, reemplazos de válvulas cardíacas, articulaciones artificiales y otros implantes quirúrgicos. Los Centers for Disease Control estiman que más del 65 % de las infecciones nosocomiales (adquiridas en el hospital) son causadas por biopelículas. Las biopelículas fúngicas también contaminan frecuentemente los dispositivos médicos. Causan infecciones vaginales crónicas y conducen a infecciones sistémicas potencialmente mortales en personas con sistemas inmunes debilitados. Las biopelículas también están involucradas en numerosas enfermedades. Por ejemplo, los pacientes con fibrosis quística tienen infecciones por *Pseudomonas* y *B. cenocepacia* que a menudo dan como resultado biopelículas resistentes a los antibióticos.
25
30

35 El término "inhibir, competir o valorar" da a entender una reducción o prevención en la formación de la matriz de ADN/proteína que es un componente de una biopelícula microbiana.

Un "polipéptido o proteína de ADN BII" da a entender una proteína o polipéptido de unión a ADN que está compuesto de dominios de unión a ADN y, por lo tanto, tiene una afinidad específica o general por el ADN microbiano. En un aspecto, se unen al ADN en el surco menor. Un ejemplo no limitante de una proteína de ADN BII es una proteína del factor huésped de integración (IHF). Otras proteínas de unión al ADN que pueden estar asociadas con la biopelícula incluyen DPS (Genbank Acceso No.: CAA49169), H-NS (Genbank Acceso No.: CAA47740), Hfq (Genbank Acceso No.: ACE63256), CbpA (Genbank Acceso No.: BAA03950) y CbpB (Genbank Acceso No.: NP_418813).
40

45 Una proteína del "factor huésped de integración" es una proteína bacteriana que los bacteriófagos utilizan para incorporar su ADN a la bacteria huésped. También se unen al ADN microbiano extracelular.

"HMGB1 es una proteína 1 de la caja del grupo de alta movilidad (HMGB) que se informa que se une y distorsiona el surco menor del ADN y es un ejemplo de un agente interferente. La proteína y el polipéptido recombinante o aislado está disponible comercialmente en Atgenglobal, ProSpecBio, Protein1 y Abnova.

50 "HU" se refiere a una clase de proteínas heterodiméricas típicamente asociadas con *E. coli*. Se sabe que las proteínas HU se unen a las uniones de ADN. Las proteínas relacionadas se han aislado de otros microorganismos. La secuencia de aminoácidos completa de *E. coli* HU fue reportada por Laine et al. (1980) Eur. J. Biochem. 103 (3): 447-481. Los anticuerpos contra la proteína HU están disponibles comercialmente en Abcam.

55 "HU" o "proteína similar a histona de la cepa U93 de *E. coli*" se refiere a una clase de proteínas heterodiméricas típicamente asociadas con *E. coli*. Se sabe que las proteínas HU se unen a las uniones de ADN. Las proteínas relacionadas se han aislado de otros microorganismos. La secuencia de aminoácidos completa de HU de *E. coli* fue reportada por Laine et al. (1980) Eur. J. Biochem, 103 (3) 447-481. Los anticuerpos para la proteína HU están disponibles comercialmente en Abeam. Los genes que codifican las subunidades de la proteína HU en *E. coli* son *hupA* y *hupB* correspondientes a las SEQ ID Nos: 28 y 29, respectivamente. Los homólogos de estos genes se

encuentran en otros organismos, y los péptidos correspondientes a estos genes de otros organismos se pueden encontrar en la Tabla 4.

El "ADN microbiano" da a entender el ADN monocatenario o bicatenario de un microorganismo que produce una biopelícula.

5 "Inhibir, prevenir o descomponer" una biopelícula da a entender la reducción profiláctica o terapéutica en la estructura de una biopelícula.

Un "agente interferente" da a entender uno cualquiera o más de un agente que compite, inhibe, previene, titula u ocluye un polipéptido de ADN BII tal como el IHF a un ADN microbiano o también descomponga una biopelícula microbiana. Puede ser uno cualquiera o más de una molécula química o biológica. Por ejemplo, IHF puede unir, 10 doblar o distorsionar específicamente estructuras de ADN tal como el ADN que contiene uniones de cuatro vías, aductos de cis-platino, bucles de ADN o protuberancias de bases. Ejemplos de tales agentes, sin limitación, incluyen (1) moléculas pequeñas que inhiben la actividad de unión al ADN del IHF, (2) moléculas pequeñas tales como las poliaminas y la espermina que compiten con el IHF en la unión del ADN, (3) polipéptidos tales como fragmentos de péptidos de IHF que compiten con IHF en la unión de ADN, (4) anticuerpos o fragmentos de los mismos dirigidos a IHF, o (5) polinucleótidos de cuatro vías o doblados u otros tipos de polinucleótidos que contienen estructuras de ADN dobladas o distorsionadas que compiten en la unión de IHF. Una "molécula pequeña que inhibe la unión de un 15 IHF a un ácido nucleico" se refiere a (1) o (2) anteriores e incluye aquellos que se unen al ADN en el surco menor, es decir, moléculas de unión al surco menor. Un "polinucleótido de cuatro vías" da a entender un polinucleótido que contiene una unión de cuatro vías, también conocida como la unión de Holliday, entre cuatro cadenas de ADN.

20 Un "polinucleótido doblado" da a entender un polinucleótido de doble cadena que contiene un pequeño bucle en una cadena la cual no se empareja con la otra cadena. En algunas realizaciones, el bucle es de 1 base a aproximadamente 20 bases de largo, o alternativamente de 2 bases a aproximadamente 15 bases de largo, o alternativamente de aproximadamente 3 bases a aproximadamente 12 bases de largo, o alternativamente de aproximadamente 4 bases a aproximadamente 10 bases de largo, o alternativamente tiene aproximadamente 4, 5 o 25 6, o 7, u 8, o 9, o 10 bases.

Los "polipéptidos que compiten con el IHF en la unión al ADN" dan a entender proteínas o péptidos que ocluyen o compiten con el IHF en la unión de estructuras de ADN dobladas o distorsionadas pero que no forman una biopelícula con el ADN. Ejemplos, sin limitación, incluyen fragmentos de IHF que incluyen uno o más dominios de unión a ADN del IHF, o sus equivalentes biológicos. Los dominios de unión al ADN se muestran en la Figura 9.

30 Un "sujeto" de diagnóstico o tratamiento es una célula o un animal tal como un mamífero o un humano. Animales no humanos sujetos a diagnóstico o tratamiento y son aquellos sujetos a infecciones o modelos animales, por ejemplo, simios, murinos, tales como ratas, ratones, chinchilla, caninos, tales como perros, lepóridos, tales como conejos, ganado, animales de deporte y mascotas.

El término "proteína", "péptido" y "polipéptido" se usan indistintamente y en su sentido más amplio dan a entender un compuesto de dos o más aminoácidos de subunidades, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar enlazadas por uniones peptídicas. En otra realización, la subunidad puede estar enlazada por otras uniones, por ejemplo, éster, éter, etc. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos y no se limita el número máximo de aminoácidos que pueden comprender una secuencia del péptido o la proteína. Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen glicina y tanto los isómeros ópticos D y L, como análogos de aminoácidos y peptidomiméticos.

Un "polipéptido c-terminal" da a entender la mitad c-terminal de un polipéptido. Como ejemplo, para los polipéptidos que contienen 90 aminoácidos, el polipéptido c-terminal comprendería los aminoácidos 46 a 90. En otro aspecto, el término se refiere a los 20 aminoácidos c-terminales del terminal carboxilo.

45 Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen (por ejemplo, una sonda, cebador, etiqueta EST o SAGE), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, iARN, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si está presente, se pueden impartir modificaciones a la estructura de nucleótidos antes o después del ensamblaje del polinucleótido. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes que no son 55 nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente marcador. El término también se refiere tanto a las moléculas bicatenarias como monocatenarias. A menos que se especifique o requiera otra cosa, cualquier realización de esta invención que sea

un polinucleótido abarca tanto la forma bicatenaria como cada una de las dos formas complementarias monocatenarias conocidas o previstas para formar la forma bicatenaria.

Un polinucleótido está compuesto por una secuencia específica de cuatro bases de nucleótidos: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); y uracilo (U) para timina cuando el polinucleótido es ARN. Por lo tanto, el término "secuencia polinucleotídica" es la representación alfabética de una molécula polinucleotídica. Esta representación alfabética puede ingresarse en bases de datos en un ordenador que tiene una unidad central de procesamiento y usarse para aplicaciones bioinformáticas tales como la genómica funcional y la búsqueda de homología.

El término "aislado" o "recombinante" como se usa en el presente documento con respecto a los ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN, se refiere a moléculas separadas de otros ADN o ARN, respectivamente, que están presentes en la fuente natural de la macromolécula, así como en los polipéptidos. El término "ácido nucleico aislado o recombinante" pretende incluir fragmentos de ácidos nucleicos que no son de origen natural como fragmentos y no se encontrarían en el estado natural. El término "aislado" también se usa en el presente documento para referirse a polinucleótidos, polipéptidos y proteínas que están aislados de otras proteínas celulares y está destinado a abarcar tanto polipéptidos purificados como recombinantes. En otras realizaciones, el término "aislado o recombinante" significa separado de constituyentes, celulares y de otro tipo, en los que la célula, tejido, polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmentos de los mismos, los cuales normalmente están asociados en la naturaleza. Por ejemplo, una célula aislada es una célula que está separada del tejido o células de fenotipo o genotipo diferente. Un polinucleótido aislado se separa de los nucleótidos contiguos 3' y 5' con los cuales normalmente está asociado en su entorno nativo o natural, por ejemplo, en el cromosoma. Como es evidente para los expertos en la técnica, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de origen no natural no requiere "aislamiento" para distinguirlo de su contraparte de origen natural.

Debe inferirse sin una citación explícita y, a menos que se pretenda otra cosa, que cuando la presente invención se refiere a un polipéptido, proteína, polinucleótido o anticuerpo, da a entender un equivalente o biológicamente equivalente dentro del ámbito de esta invención. Como se usa en el presente documento, el término "equivalente biológico del mismo" pretende ser sinónimo de "equivalente del mismo" cuando se refiere a una proteína, anticuerpo, polipéptido o ácido nucleico de referencia, pretende aquellos que tienen una homología o identidad de secuencia mínima mientras mantienen la estructura o funcionalidad deseada. A menos que se mencione específicamente en este documento, se contempla que cualquier polinucleótido, polipéptido o proteína mencionado en el presente documento también incluya sus equivalentes. Por ejemplo, un equivalente da a entender al menos aproximadamente 60 %, o alternativamente al menos aproximadamente 65 %, o alternativamente al menos aproximadamente 70 %, o alternativamente al menos aproximadamente 75 %, o alternativamente al menos aproximadamente 80 %, o alternativamente aproximadamente al menos aproximadamente 85 %, o alternativamente al menos aproximadamente 90 %, o alternativamente al menos aproximadamente 95 %, o alternativamente 98 % por ciento de homología o identidad de secuencia y exhibe actividad biológica sustancialmente equivalente a la proteína, polipéptido o ácido nucleico de referencia. Se proporcionan ejemplos de polipéptidos biológicamente equivalentes en la Tabla 2, y los fragmentos Arm identificados en la Tabla 2, los cuales identifican sustituciones conservadoras de aminoácidos a las secuencias de aminoácidos preferidas.

Un polinucleótido o región polinucleotídica (o un polipéptido o región polipeptídica) que tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %) de identidad de secuencia "a otra secuencia significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son los mismos al comparar las dos secuencias. La alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar utilizando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en Protocolos actuales en biología molecular (Ausubel et al., Eds. 1987) Suplemento 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7. 1) Preferiblemente, los parámetros predeterminados se usan para la alineación. Un programa de alineación preferido es BLAST, que utiliza parámetros predeterminados. En particular, los programas preferidos son BLASTN y BLASTP, que utilizan los siguientes parámetros predeterminados: Código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; corte = 60; espera = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = PUNTUACIÓN ALTA; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + Traducciones de CDS GenBank + SwissProtein + SPupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de Internet: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST.

"Homología" o "identidad" o "similitud" se refiere a la similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear para fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, las moléculas son homólogas en esa posición. Un grado de homología entre secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las secuencias. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos del 40 % de identidad, o alternativamente menos del 25 % de identidad, con una de las secuencias de la presente invención.

"Homología" o "identidad" o "similitud" también pueden referirse a dos moléculas de ácido nucleico que se hibridan bajo condiciones rigurosas.

La "hibridación" se refiere a una reacción en la cual uno o más polinucleótidos reaccionan para formar un complejo que se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre las bases de los residuos de nucleótidos. La unión de hidrógeno puede ocurrir mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick, la unión de Hoogsteen o de cualquier otra manera específica de secuencia. El complejo puede comprender dos cadenas que forman una estructura dúplex, tres o más cadenas que forman un complejo multicatenario, una cadena autohibridante individual o cualquier combinación de estos. Una reacción de hibridación puede constituir una etapa en un proceso más extenso, tal como el inicio de una reacción de PCR o la escisión enzimática de un polinucleótido por una ribozima.

Ejemplos de condiciones de hibridación restrictivas incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C; concentraciones de tampón de hibridación de aproximadamente 6 x SSC a aproximadamente 10 x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 0 % a aproximadamente 25 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 4 x SSC a aproximadamente 8 x SSC. Ejemplos de condiciones de hibridación moderadas incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C; concentraciones de tampón de aproximadamente 9 x SSC a aproximadamente 2 x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 30 % a aproximadamente 50 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 5 x SSC a aproximadamente 2 x SSC. Ejemplos de condiciones de alta rigurosidad incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 68 °C; concentraciones de tampón de aproximadamente 1 x SSC a aproximadamente 0,1 x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente 55 % a aproximadamente 75 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 1 x SSC, 0,1 x SSC o agua desionizada. En general, los tiempos de incubación de hibridación son de 5 minutos a 24 horas, con 1, 2 o más etapas de lavado, y los tiempos de incubación de lavado son de aproximadamente 1, 2 o 15 minutos. SSC es NaCl 0,15 M y tampón citrato 15 mM. Se entiende que se pueden emplear equivalentes de SSC que usan otros sistemas tampón.

Como se usa en el presente documento, "expresión" se refiere al proceso mediante el cual los polinucleótidos se transcriben en ARNm y/o el proceso por el cual el ARNm transcrito se traduce subsecuentemente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el polinucleótido se deriva del ADN genómico, la expresión puede incluir el empalme del ARNm en una célula eucariota.

El término "codificar" tal como se aplica a los polinucleótidos se refiere a un polinucleótido que se dice que "codifica" un polipéptido si, en su estado nativo o cuando es manipulado por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, puede transcribirse y/o traducido para producir el ARNm para el polipéptido y/o un fragmento del mismo. La cadena antisentido es el complemento de tal ácido nucleico, y la secuencia codificante se puede deducir de ella.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y similares se usan en el presente documento para significar obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente un trastorno o signo o síntoma del mismo, y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de un trastorno y/o efecto adverso atribuible al trastorno.

Prevenir tiene la intención de prevenir un trastorno o efecto *in vitro* o *in vivo* en un sistema o sujeto que está predispuesto al trastorno o efecto. Un ejemplo de esto es prevenir la formación de una biopelícula en un sistema que está infectado con un microorganismo que se sabe que produce uno.

Una "composición" se entiende con el significado de una combinación de agente activo y otro compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o marcador detectable) o activo, tal como un adyuvante.

Una "composición farmacéutica" se entiende que incluye la combinación de un agente activo con un vehículo, inerte o activo, haciendo que la composición sea adecuada para uso diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

"Vehículos farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualesquier diluyentes, excipientes, polímeros, micelas, liposomas, vectores, plásmidos o vehículos que puedan usarse en las composiciones de la invención. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como la albúmina sérica humana, sustancias tampón, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato disódico, hidrógeno fosfato potásico, cloruro de sodio, sales de zinc, sílica coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímero de bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y grasa de lana. Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, un texto de referencia estándar en este campo. Se seleccionan preferiblemente con respecto a la forma de administración prevista, es decir, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes y similares, y de acuerdo con las prácticas farmacéuticas convencionales.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable pueden incluir soluciones acuosas estériles (donde los componentes son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, una composición para administración parenteral debe ser estéril y

debe ser fluida en la medida en que exista una fácil capacidad de aplicación mediante jeringa. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

5 Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, pastillas o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo fluido para usar como enjuague bucal. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles y/o los materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, 10 píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o sabores de naranja.

15 Para la administración por inhalación, los compuestos pueden administrarse en forma de espray de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado el cual contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

Un "agente biológicamente activo" o un agente activo de esta invención pretende uno o más de un polipéptido aislado o recombinante, un polinucleótido aislado o recombinante, un vector, una célula huésped aislada o un anticuerpo, así como composiciones que comprenden uno o más de lo mismo.

20 La "administración" se puede efectuar en una dosis, de forma continua o intermitente durante el curso del tratamiento. Los expertos en la materia conocen los procedimientos para determinar los medios y la dosis de administración más efectivos y variarán con la composición utilizada para la terapia, el propósito de la terapia, la célula objetivo que se está tratando y el sujeto que se está tratando. Se pueden realizar administraciones únicas o múltiples con el nivel de dosis y el patrón seleccionados por el médico tratante. Las formulaciones de dosificación 25 adecuadas y los procedimientos de administración de los agentes son conocidos en la técnica. La ruta de administración también se puede determinar y el procedimiento para determinar la ruta de administración más efectiva es conocido por los expertos en la técnica y variará con la composición utilizada para el tratamiento, el propósito del tratamiento, el estado de salud o la etapa de la enfermedad del sujeto que se va a tratar, y célula o tejido diana. Ejemplos no limitativos de vía de administración incluyen administración oral, administración nasal, 30 inyección y aplicación tópica.

Un agente de la presente invención puede administrarse para terapia por cualquier vía de administración adecuada. También se apreciará que la ruta preferida variará con la condición y edad del receptor, y la enfermedad que se va a tratar.

35 El término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para lograr un efecto deseado. En el contexto de aplicaciones terapéuticas o profilácticas, la cantidad efectiva dependerá del tipo y la gravedad de la afección en cuestión y las características del sujeto individual, tales como salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a las composiciones farmacéuticas. En el contexto de una composición inmunogénica, en algunas realizaciones, la cantidad efectiva es la cantidad suficiente para dar como resultado una respuesta protectora contra un patógeno. En otras realizaciones, la cantidad efectiva de una composición inmunogénica es la cantidad suficiente para dar como resultado la generación de anticuerpos contra el antígeno. En algunas realizaciones, la cantidad efectiva es la 40 cantidad requerida para conferir inmunidad pasiva a un sujeto que lo necesita. Con respecto a las composiciones inmunogénicas, en algunas realizaciones la cantidad efectiva dependerá del uso pretendido, el grado de inmunogenicidad de un compuesto antigénico particular y la salud/capacidad de respuesta del sistema inmune del sujeto, además de los factores descritos anteriormente. El experto en la técnica podrá determinar las cantidades apropiadas dependiendo de estos y otros factores. 45

En el caso de una aplicación *in vitro*, en algunas realizaciones la cantidad efectiva dependerá del tamaño y la naturaleza de la aplicación en cuestión. También dependerá de la naturaleza y sensibilidad del objetivo *in vitro* y los procedimientos en uso. El experto en la técnica podrá determinar la cantidad efectiva basándose en estas y otras consideraciones. La cantidad efectiva puede comprender una o más administraciones de una composición dependiendo de la realización. 50

El término "fracción conjugada" se refiere a una fracción que puede añadirse a un polipéptido quimérico aislado formando un enlace covalente con un residuo de polipéptido quimérico. La fracción puede unirse directamente a un residuo del polipéptido quimérico o puede formar un enlace covalente con un conector que a su vez forma un enlace covalente con una fracción del polipéptido quimérico.

55 Un "conjugado peptídico" se refiere a la asociación por enlace covalente o no covalente de uno o más polipéptidos y otro compuesto químico o biológico. En un ejemplo no limitante, la "conjugación" de un polipéptido con un compuesto químico da como resultado una estabilidad o eficacia mejorada del polipéptido para su propósito

pretendido. En una realización, un péptido se conjuga con un vehículo, en el que el vehículo es un liposoma, una micela o un polímero farmacéuticamente aceptable.

Los "liposomas" son vesículas microscópicas que consisten en bicapas lipídicas concéntricas. Estructuralmente, los liposomas varían en tamaño y forma desde tubos largos hasta esferas, con dimensiones desde unos pocos cientos de Angstroms hasta fracciones de un milímetro. Los lípidos formadores de vesículas se seleccionan para lograr un grado específico de fluidez o rigidez del complejo final que proporciona la composición lipídica de la capa externa. Estos son neutros (colesterol) o bipolares e incluyen fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y esfingomielina (SM) y otros tipos de lípidos bipolares que incluyen, pero no se limitan a dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), con una longitud de cadena de hidrocarburos en el rango de 14-22, y saturada o con uno o más enlaces dobles C=C. Ejemplos de lípidos capaces de producir un liposoma estable, solo o en combinación con otros componentes lipídicos son los fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, cefalina, cardiopina, ácido fosfatídico, cerebrósidos, diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoil oleoil fosfatidiletanolamina (POPE) y dioleoilfosfatidiletanolamina 4- (N-maleimido-metil) ciclohexano-1-carboxilato (DOPE-mal). Los lípidos adicionales que no contienen fósforo que pueden incorporarse a los liposomas incluyen estearilamina, dodecilamina, hexadecilamina, miristato de isopropilo, trietanolamina-laurilsulfato, sulfato de alquil-arilo, palmitato de acetilo, ricinoleato de glicerol, estearato de hexadecilo, polímeros acrílicos anfóteros, amidas de ácidos grasos polietiloxilados, y los lípidos catiónicos mencionados anteriormente (DDAB, DODAC, DMRIE, DMTAP, DOGS, DOTAP (DOTMA), DOSPA, DPTAP, DSTAP, DC-Chol). Los lípidos cargados negativamente incluyen ácido fosfatídico (PA), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidilglicerol y (DOPG), dicetilfosfato que pueden formar vesículas. Típicamente, los liposomas se pueden dividir en tres categorías en base a su tamaño general y la naturaleza de la estructura lamelar. Las tres clasificaciones, desarrolladas por la New York Academy Sciences Meeting, "Liposomes and Their Use in Biology and Medicine," diciembre de 1977, son vesículas multilamelares (MLV), pequeñas vesículas unilamelares (SUVs) y grandes vesículas unilamelares (LUV). Los agentes biológicos activos se pueden encapsular en tales para la administración de acuerdo con los procedimientos descritos en este documento.

Una "micela" es un agregado de moléculas tensioactivas dispersas en un coloide líquido. Una micela típica en solución acuosa forma un agregado con las regiones de "cabeza" hidrofílicas en contacto con el disolvente circundante, secuestrando las regiones de la cola hidrófobas en el centro de la micela. Este tipo de micela se conoce como micela de fase normal (micela de aceite en agua). Las micelas inversas tienen los grupos de cabeza en el centro con las colas extendidas (micela de agua en aceite). Las micelas se pueden usar para unir un polinucleótido, polipéptido, anticuerpo o composición descritos en este documento para facilitar el suministro eficiente a la célula o tejido diana.

La expresión "polímero farmacéuticamente aceptable" se refiere al grupo de compuestos que pueden conjugarse con uno o más polipéptidos descritos aquí. Se contempla que la conjugación de un polímero con el polipéptido es capaz de extender la vida media del polipéptido *in vivo* e *in vitro*. Ejemplos no limitantes incluyen polietilenglicoles, polivinilpirrolidonas, polivinilalcoholes, derivados de celulosa, poliacrílatos, polimetacrílatos, azúcares, polioles y mezclas de los mismos. Los agentes biológicos activos se pueden conjugar con un polímero farmacéuticamente aceptable para la administración de acuerdo con los procedimientos descritos en este documento.

Un "vehículo de suministro de genes" se define como cualquier molécula que puede transportar polinucleótidos insertados en una célula huésped. Ejemplos de vehículos de suministro de genes son liposomas, micelas de polímeros biocompatibles, que incluyen polímeros naturales y polímeros sintéticos; lipoproteínas; polipéptidos; polisacáridos; lipopolisacáridos; sobres virales artificiales; partículas de metal; y bacterias, o virus, tales como baculovirus, adenovirus y retrovirus, bacteriófagos, cósmidos, plásmidos, vectores fúngicos y otros vehículos de recombinación típicamente utilizados en la técnica que se han descrito para la expresión en una variedad de huéspedes eucariotas y procariotas, y pueden usarse tanto para terapia génica como para expresión simple de proteínas.

Un polinucleótido de esta invención puede administrarse a una célula o tejido usando un vehículo de suministro de genes. "Suministro génico", "transferencia génica", "transducción" y similares como se usan en el presente documento, son términos que se refieren a la introducción de un polinucleótido exógeno (a veces denominado como "transgén") en una célula huésped, independientemente del procedimiento utilizado para la introducción. Tales procedimientos incluyen una variedad de técnicas bien conocidas, tales como la transferencia génica mediada por vectores (por ejemplo, por infección/transfección viral, u otros complejos de suministro de genes en base a proteínas o en base a lípidos), así como técnicas que facilitan el suministro de "polinucleótidos desnudos (tales como electroporación, suministro de" pistola de genes "y diversas otras técnicas utilizadas para la introducción de polinucleótidos). El polinucleótido introducido puede mantenerse estable o transitoriamente en la célula huésped. El mantenimiento estable típicamente requiere que el polinucleótido introducido contenga un origen de replicación compatible con la célula huésped o se integre en un replicón de la célula huésped tal como un replicón extracromosómico (por ejemplo, un plásmido) o un cromosoma nuclear o mitocondrial. Se sabe que varios vectores son capaces de mediar la transferencia de genes a células de mamífero, como se conoce en la técnica y se describe aquí.

Un "plásmido" es una molécula de ADN extracromosómica separada del ADN cromosómico que es capaz de replicarse independientemente del ADN cromosómico. En muchos casos, es circular y de doble cadena. Los plásmidos proporcionan un mecanismo para la transferencia horizontal de genes dentro de una población de microbios y típicamente proporcionan una ventaja selectiva en un estado ambiental dado. Los plásmidos pueden portar genes que proporcionan resistencia a los antibióticos de origen natural en un nicho ambiental competitivo, o alternativamente las proteínas producidas pueden actuar como toxinas bajo circunstancias similares.

Los "plásmidos" utilizados en ingeniería genética se denominan "vectores plasmídicos". Muchos plásmidos están disponibles comercialmente para tales usos. El gen que se va a replicar se inserta en copias de un plásmido que contiene genes que hacen que las células sean resistentes a antibióticos particulares y un sitio de clonación múltiple (MCS o polienlazador), el cual es una región corta que contiene varios sitios de restricción comúnmente utilizados que permiten la fácil inserción de fragmentos de ADN en esta ubicación. Otro uso importante de los plásmidos es hacer grandes cantidades de proteínas. En este caso, los investigadores cultivan bacterias que contienen un plásmido que alberga el gen de interés. Así como la bacteria produce proteínas para conferir resistencia a los antibióticos, también puede ser inducida a producir grandes cantidades de proteínas a partir del gen insertado. Esta es una manera barata y fácil de producir en masa un gen o la proteína que luego codifica.

Un "cromosoma artificial de levadura" o "YAC" se refiere a un vector utilizado para clonar fragmentos de ADN grandes (mayores de 100 kb y hasta 3000 kb). Es un cromosoma construido artificialmente y contiene las secuencias de origen telomérico, centromérico y de replicación necesarias para la replicación y preservación en las células de levadura. Construidos utilizando un plásmido circular inicial, se linealizan mediante el uso de enzimas de restricción, y luego la ADN ligasa puede agregar una secuencia o gen de interés dentro de la molécula lineal mediante el uso de extremos cohesivos. Los vectores de expresión de levadura, tales como YAC, YIps (plásmido integrador de levadura) y YEps (plásmido episomal de levadura), son extremadamente útiles, ya que uno puede obtener productos de proteínas eucariotas con modificaciones postraduccionales, ya que las levaduras son en sí mismas células eucariotas, sin embargo, se ha encontrado que los YAC son más inestable que los BAC, produciendo efectos quiméricos.

Un "vector viral" se define como un virus o partícula viral producida de forma recombinante que comprende un polinucleótido para ser administrado en una célula huésped, ya sea *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Ejemplos de vectores virales incluyen vectores retrovirales, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores de alfavirus y similares. Los vectores basados en el virus del mosaico del tabaco infeccioso (TMV) pueden usarse para fabricar proteínas y se ha informado que expresan Griffithsin en hojas de tabaco (O'Keefe et al. (2009) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 106 (15): 6099-6104). Los vectores de alfavirus, tales como los vectores basados en el virus Semliki Forest y los vectores basados en el virus Sindbis, también se han desarrollado para su uso en terapia génica e inmunoterapia. Véase, Schlesinger and Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotecnología 5: 434-439 y Ying et al. (1999) Nat. Medicina. 5 (7): 823-827. En aspectos en los que la transferencia génica está mediada por un vector retroviral, un constructo de vector se refiere al polinucleótido que comprende el genoma retroviral o parte del mismo, y un gen terapéutico.

Como se usa en el presente documento, "transferencia génica mediada por retrovirus" o "transducción retroviral" tiene el mismo significado y se refiere al proceso mediante el cual un gen o secuencias de ácidos nucleicos se transfieren de manera estable a la célula huésped en virtud de que el virus ingresa a la célula e integra su genoma en el genoma de la célula huésped. El virus puede ingresar a la célula huésped a través de su mecanismo normal de infección o modificarse de modo que se una a un receptor o ligando de la superficie de la célula huésped diferente para ingresar a la célula. Como se usa en el presente documento, el vector retroviral se refiere a una partícula viral capaz de introducir ácido nucleico exógeno en una célula a través de un mecanismo de entrada viral o de tipo viral.

Los retrovirus llevan su información genética en forma de ARN; sin embargo, una vez que el virus infecta una célula, el ARN se transcribe inversamente en la forma de ADN que se integra en el ADN genómico de la célula infectada. La forma de ADN integrada se llama provirus.

En los aspectos en los que la transferencia génica está mediada por un vector viral de ADN, tal como un adenovirus (Ad) o un virus adenoasociado (AAV), un constructo de vector se refiere al polinucleótido que comprende el genoma viral o parte del mismo, y un transgén. Los adenovirus (Ads) son un grupo homogéneo de virus relativamente bien caracterizado, que incluye más de 50 serotipos. Véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT No. WO 95/27071. Los Ads no requieren integración en el genoma de la célula huésped. También se han construido vectores derivados de Ad recombinantes, particularmente aquellos que reducen el potencial de recombinación y generación de virus de tipo silvestre. Véanse las publicaciones internacionales PCT Nos. WO 95/00655 y WO 95/11984. El AAV de tipo silvestre tiene una alta infectividad y especificidad al integrarse en el genoma de la célula huésped. Véase, Hermonat & Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470 and Lebkowski et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996.

Los vectores que contienen tanto un promotor como un sitio de clonación en el cual un polinucleótido puede enlazarse operativamente son bien conocidos en la técnica. Tales vectores son capaces de transcribir ARN *in vitro* o *in vivo*, y están disponibles comercialmente de fuentes tales como Stratagene (La Jolla, CA) y Promega Biotech (Madison, WI). Con el fin de optimizar la expresión y/o la transcripción *in vitro*, puede ser necesario eliminar, agregar o alterar

porciones no traducidas de 5' y/o 3' de los clones para eliminar codones de iniciación de traducción alternativa inapropiados extra potenciales u otras secuencias que pueden interferir con o reducir la expresión, ya sea a nivel de transcripción o traducción. Alternativamente, los sitios de unión de ribosomas de consenso se pueden insertar inmediatamente 5' del codón de inicio para mejorar la expresión.

5 Los vehículos de suministro de genes también incluyen complejos de ADN/liposomas, micelas y complejos de proteína viral-ADN específicos. Los liposomas que también comprenden un anticuerpo dirigido o fragmento del mismo pueden usarse en los procedimientos de esta invención. Además del suministro de polinucleótidos a una célula o población celular, la introducción directa de las proteínas descritas en el presente documento a la célula o población celular puede realizarse mediante la técnica no limitante de transfección de proteínas, alternativamente cultivando
10 condiciones que pueden mejorar la expresión y/o promover la actividad de las proteínas de esta invención son otras técnicas no limitantes.

Como se usa en el presente documento, el término "ADNe" se refiere al ADN extracelular encontrado como componente de biopelículas patógenas, por ejemplo, bacterianas.

15 Como se usa en el presente documento, los términos "anticuerpos" e "inmunoglobulina" incluyen anticuerpos o inmunoglobulinas de cualquier isotipo, fragmentos de anticuerpos los cuales retienen la unión específica al antígeno, que incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab)₂, Fv, scFv, dsFv, fragmentos Fd, dominios dAb, VH, VL, VhH y V-NAR; minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y cuerpos kappa; fragmentos de anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos y una o más CDR aisladas o un paratope funcional; anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena sencilla y proteínas de fusión que
20 comprenden una porción de unión a antígeno de un anticuerpo y una proteína no anticuerpo. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos (Abs) pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos del huésped.

25 El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio e incluye específicamente anticuerpos monoclonales de longitud completa, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos humanos recombinantes, anticuerpos quiméricos, derivados de anticuerpos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, fragmento de unión a antígeno, siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

30 Como se usa en el presente documento, "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Los anticuerpos pueden marcarse de forma detectable, por ejemplo, con un radioisótopo, una enzima que genera un producto detectable, una proteína fluorescente y similares. Los anticuerpos pueden conjugarse adicionalmente con otras fracciones, tales como miembros de pares de unión específicos, por ejemplo, biotina (miembro del par de unión específica de biotina-
35 avidina), y similares. Los anticuerpos también pueden unirse a un soporte sólido, que incluye, pero no se limita a, placas o perlas de poliestireno, y similares.

Los anticuerpos monoclonales pueden generarse usando técnicas de hibridoma o procedimientos de ADN recombinante conocidos en la técnica. Las técnicas alternativas para generar o seleccionar anticuerpos incluyen la
40 exposición *in vitro* de linfocitos a antígenos de interés, y el cribado de bibliotecas de presentación de anticuerpos en células, fagos o sistemas similares.

45 El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente cada parte de la proteína (por ejemplo, CDR, marco, C_L, dominios C_H (por ejemplo, C_{H1}, C_{H2},
50 C_{H3}), bisagra, (VL VH)) es sustancialmente no inmunogénico en humanos, con solo pequeños cambios o variaciones de secuencia. Del mismo modo, los anticuerpos designados primates (mono, babuino, chimpancé, etc.), roedores (ratones, ratas, conejos, conejillos de indias, hámster y similares) y otros mamíferos designan tales especies, subgéneros, géneros, subfamilia, anticuerpos específicos de familia. Además, los anticuerpos quiméricos incluyen cualquier combinación de los anteriores. Tales cambios o variaciones opcionalmente y preferiblemente retienen o reducen la inmunogenicidad en humanos u otras especies con respecto a los anticuerpos no modificados. Por lo tanto, un anticuerpo humano es distinto de un anticuerpo quimérico o humanizado. Se señala que un anticuerpo humano puede ser producido por un animal no humano o una célula procariota o eucariota que es capaz de expresar genes de inmunoglobulina humana funcionalmente reorganizados (por ejemplo, cadena pesada y/o cadena ligera). Además, cuando un anticuerpo humano es un anticuerpo de cadena sencilla, puede comprender un péptido
60 conector que no se encuentra en los anticuerpos humanos nativos. Por ejemplo, un Fv puede comprender un

péptido enlazador, tal como de dos a aproximadamente ocho residuos de glicina u otros aminoácidos, que conecta la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Tales péptidos enlazadores se consideran de origen humano.

5 Como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano se "deriva de" una secuencia de línea germinal particular si el anticuerpo se obtiene de un sistema que usa secuencias de inmunoglobulina humana, por ejemplo, inmunizando un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana o seleccionando una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humano que se deriva de una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con la secuencia de aminoácidos de las inmunoglobulinas de línea germinal humana. Un anticuerpo humano seleccionado típicamente es al menos 90 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican al anticuerpo humano como humano en comparación con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de la línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 95 %, o incluso al menos 96 %, 97 %, 98 % o 10 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia particular de línea germinal humana no mostrará más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

Un "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una especificidad de unión única que tiene regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. El término también se refiere a anticuerpos humanos recombinantes. Los procedimientos para fabricar estos anticuerpos se describen en el presente documento.

25 El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de ellos, anticuerpos aislados de una célula huésped transformados para expresar el anticuerpo, por ejemplo, a partir de un transfectoma, anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante, 30 combinatoria de anticuerpos humanos, y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implican el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Sin embargo, en ciertas realizaciones, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien se derivan y están relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*. Los procedimientos para fabricar estos anticuerpos se describen en el presente documento.

40 Como se usa en el presente documento, los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, típicamente mediante ingeniería genética, a partir de genes de región variable y constante de anticuerpo que pertenecen a diferentes especies.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo humanizado" o "inmunoglobulina humanizada" se refiere a un anticuerpo quimérico humano/no humano que contiene una secuencia mínima derivada de 45 inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región variable del receptor se reemplazan por residuos de una región variable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo, o primates no humanos que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. Los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. El anticuerpo humanizado 50 opcionalmente también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. un anticuerpo no humano que contiene uno o más aminoácidos en una región marco, una región constante o una CDR, que han sido sustituidos con un aminoácido colocado correspondientemente de un anticuerpo humano. En general, se espera que los anticuerpos humanizados produzcan una respuesta inmune reducida en un huésped humano, en comparación con una versión no humanizada 55 del mismo anticuerpo. Los anticuerpos humanizados pueden tener sustituciones conservadoras de aminoácidos que no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la unión al antígeno u otras funciones del anticuerpo. Los grupos de sustituciones conservadoras incluyen: glicina-alanina, valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, serina-treonina y asparagina-glutamina.

60 Como se usa en el presente documento, el término "derivado de anticuerpo" comprende un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de un anticuerpo, en el que uno o más de los aminoácidos se modifican químicamente por alquilación, pegilación, acilación, formación de éster o formación de amida o similares, por ejemplo, para enlazar el

anticuerpo a una segunda molécula. Esto incluye, pero no se limita a, anticuerpos pegilados, anticuerpos cisteína-pegilados y variantes de los mismos.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoc conjugado" comprende un anticuerpo o un derivado de anticuerpo asociado con o enlazado a un segundo agente, tal como un agente citotóxico, un agente detectable, un marcador fluorescente, un agente radiactivo, un agente de direccionamiento, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo sintético, un anticuerpo semisintético o un anticuerpo multiespecífico.

Como se usa en el presente documento, el término "marcador detectable" da a entender un compuesto o composición detectable directa o indirectamente que se conjuga directa o indirectamente a la composición a detectar, por ejemplo, etiquetas de histadina N-terminal (N-His), isótopos magnéticamente activos, por ejemplo, ^{115}Sn , ^{117}Sn y ^{119}Sn , un isótopo no radioactivo tal como ^{13}C y ^{15}N , polinucleótido o proteína tal como un anticuerpo para generar una composición "marcada". El término también incluye secuencias conjugadas con el polinucleótido que proporcionarán una señal tras la expresión de las secuencias insertadas, tal como la proteína verde fluorescente (GFP) y similares. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable. Las etiquetas pueden ser adecuadas para la detección a pequeña escala o más adecuadas para la detección de alto rendimiento. Como tales, los marcadores adecuados incluyen, pero no se limitan a isótopos magnéticamente activos, isótopos no radioactivos, radioisótopos, fluorocromos, compuestos luminiscentes, colorantes y proteínas, incluidas las enzimas. La etiqueta puede detectarse simplemente o puede cuantificarse. Una respuesta que simplemente se detecta generalmente comprende una respuesta cuya existencia simplemente se confirma, mientras que una respuesta que se cuantifica generalmente comprende una respuesta que tiene un valor cuantificable (por ejemplo, informable numéricamente) tal como una intensidad, polarización y/u otra propiedad. En los ensayos de luminiscencia o fluorescencia, la respuesta detectable puede generarse directamente usando un luminóforo o fluoróforo asociado con un componente de ensayo realmente involucrado en la unión, o indirectamente usando un luminóforo o fluoróforo asociado con otro componente (por ejemplo, informador o indicador).

Ejemplos de marcadores luminiscentes que producen señales incluyen, pero no se limitan a, bioluminiscencia y quimioluminiscencia. La respuesta de luminiscencia detectable generalmente comprende un cambio en o una aparición de una señal de luminiscencia. Los procedimientos y luminóforos adecuados para el etiquetado luminiscente de componentes de ensayo son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6ª ed.). Ejemplos de sondas luminiscentes incluyen, pero no se limitan a, aequorina y luciferasas.

Ejemplos de marcadores fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde de malacita, estilbeno, Lucifer Yellow, Cascade Blue™ y Texas Red. Otros colorantes ópticos adecuados se describen en el Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6th ed.).

En otro aspecto, el marcador fluorescente se funcionaliza para facilitar la unión covalente a un componente celular presente en o sobre la superficie de la célula o tejido tal como un marcador de superficie celular. Grupos funcionales adecuados, que incluyen, pero no se limitan a, grupos isotiocianato, grupos amino, grupos haloacetilo, maleimididas, ésteres de succinimidilo y haluros de sulfonilo, todos los cuales pueden usarse para unir el marcador fluorescente a una segunda molécula. La selección del grupo funcional de marcador fluorescente dependerá del sitio de unión a bien sea un enlazador, al agente, al marcador o al segundo agente de marcación.

Ejemplos de marcadores fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde de malacita, estilbeno, Lucifer Yellow, Cascade Blue® y Texas Red®. Otros colorantes ópticos adecuados se describen en el Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6th ed.).

En otro aspecto, el marcador fluorescente se funcionaliza para facilitar la unión covalente a un componente celular presente en o sobre la superficie de la célula o tejido tal como un marcador de superficie celular. Grupos funcionales adecuados, que incluyen, pero no se limitan a, grupos isotiocianato, grupos amino, grupos haloacetilo, maleimididas, ésteres de succinimidilo y haluros de sulfonilo, todos los cuales pueden usarse para unir el marcador fluorescente a una segunda molécula. La elección del grupo funcional del marcador fluorescente dependerá del sitio de unión bien sea a un enlazador, al agente, al marcador o al segundo agente de marcación.

Las "células eucariotas" comprenden todos los reinos de la vida, excepto los monera. Se pueden distinguir fácilmente a través de un núcleo unido a la membrana. Los animales, hongos y protistas son eucariotas u organismos cuyas células están organizadas en estructuras complejas por membranas internas y un citoesqueleto. La estructura unida a la membrana más característica es el núcleo. A menos que se mencione específicamente, el término "huésped" incluye un huésped eucariota, que incluye, por ejemplo, células de levadura, plantas superiores, insectos y mamíferos. Ejemplos no limitantes de células u hospedadores eucariotas incluyen simio, bovino, porcino, murino, rata, aviar, reptil y humano.

Las "células procariotas" que usualmente carecen de núcleo o de cualquier otro orgánulo unido a la membrana y se dividen en dos dominios, bacterias y arqueas. Además, en lugar de tener ADN cromosómico, la información genética de estas células está en un bucle circular llamado plásmido. Las células bacterianas son muy pequeñas, aproximadamente del tamaño de una mitocondria animal (aproximadamente 1-2 μm de diámetro y 10 μm de largo).
 5 Las células procariotas presentan tres formas principales: en forma de varilla, esféricas y espirales. En lugar de pasar por elaborados procesos de replicación como eucariotas, las células bacterianas se dividen por fisión binaria. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, la bacteria *bacillus*, la bacteria *E. coli* y la bacteria *Salmonella*.

Un antígeno "nativo" o "natural" es un polipéptido, proteína o un fragmento el cual contiene un epítipo, el cual se ha aislado de una fuente biológica natural, y que puede unirse específicamente a un receptor de antígeno, en particular un receptor de antígeno de células T (TCR), en un sujeto.

Los términos "antígeno" y "antigénico" se refieren a moléculas con la capacidad de ser reconocidas por un anticuerpo o de otro modo actuar como un miembro de un par anticuerpo-ligando. "Unión específica" se refiere a la interacción de un antígeno con las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina. La unión anticuerpo-antígeno puede ocurrir *in vivo* o *in vitro*. El experto en la técnica comprenderá que las macromoléculas, incluidas las proteínas, los ácidos nucleicos, los ácidos grasos, los lípidos, los lipopolisacáridos y los polisacáridos tienen el potencial de actuar como antígeno. El experto en la técnica comprenderá además que los ácidos nucleicos que codifican una proteína con el potencial de actuar como un ligando de anticuerpos codifican necesariamente un antígeno. El artesano comprenderá además que los antígenos no se limitan a moléculas de longitud completa, sino que también pueden incluir moléculas parciales. El término "antigénico" es una referencia adjetiva a moléculas que tienen las propiedades de un antígeno. El término abarca sustancias las cuales son inmunogénicas, es decir, inmunógenos, así como sustancias las cuales inducen falta de respuesta inmunológica, o anergia, es decir, anérgenos.

Un "antígeno alterado" es uno que tiene una secuencia primaria que es diferente de la del antígeno de tipo silvestre correspondiente. Los antígenos alterados pueden prepararse mediante procedimientos sintéticos o recombinantes e incluyen, pero no se limitan a, péptidos antigénicos que se modifican de manera diferencial durante o después de la traducción, por ejemplo, por fosforilación, glucosilación, entrecruzamiento, acilación, escisión proteolítica, enlace a una molécula de anticuerpo, molécula de membrana u otro ligando. (Ferguson et al. (1988) Ann. Rev. Biochem. 57: 285-320). Se pretende que un antígeno sintético o alterado de la invención se una al mismo TCR que el epítipo natural.

Un "autoantígeno" también denominado en el presente documento antígeno nativo o de tipo silvestre es un péptido antigénico que induce poca o ninguna respuesta inmune en el sujeto debido a la autotolerancia al antígeno. Un ejemplo de autoantígeno es el antígeno específico de melanoma gp100.

Los términos "complejo principal de histocompatibilidad" o "MHC" se refieren a un complejo de genes que codifican moléculas de la superficie celular que se requieren para la presentación del antígeno a las células T y para el rápido rechazo del injerto. En humanos, el MHC también se conoce como el "antígeno leucocitario humano" o complejo "HLA". Las proteínas codificadas por el MHC se conocen como "moléculas MHC" y se clasifican en moléculas MHC de clase I y clase II. El MHC de clase I incluye proteínas heterodiméricas de membrana formadas por una cadena α codificada en el MHC unido de forma no covalente a la β 2-microglobulina. Las moléculas de MHC de clase I son expresadas por casi todas las células nucleadas y se ha demostrado que funcionan en la presentación del antígeno a las células T CD8+. Las moléculas de clase I incluyen HLA-A, B y C en humanos. Las moléculas de MHC de clase II también incluyen proteínas heterodiméricas de membrana que consisten en cadenas α y β asociadas de forma no covalente. Se sabe que las moléculas MHC de clase II funcionan en células T CD4+ y, en humanos, incluyen HLA-DP, -DQ y DR. En una realización preferente, las composiciones y ligandos de la invención pueden formar complejos con moléculas de MHC de cualquier tipo de HLA. Los expertos en la técnica están familiarizados con los serotipos y genotipos del HLA. Véase: bimas.dcrf.nih.gov/cgi-bin/molbio/hla página de visualización del coeficiente. Rammensee H. G., Bachmann J. y Stevanovic S. MHC Ligands and Peptide Motifs (1997) Chapman & Hall Publishers; Schreuder G. M. Th. et al. El diccionario HLA (1999) Tissue Antigens 54: 409-437.

"Respuesta inmune" se refiere en general a las respuestas específicas de antígeno de los linfocitos a sustancias extrañas. Los términos "inmunógeno" e "inmunogénico" se refieren a moléculas con la capacidad de provocar una respuesta inmune. La respuesta puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunes. La respuesta puede ocurrir *in vivo* o *in vitro*. El experto en la técnica entenderá que una variedad de macromoléculas, que incluyen proteínas, ácidos nucleicos, ácidos grasos, lípidos, lipopolisacáridos y polisacáridos, tienen el potencial de ser inmunogénicos. El experto en la técnica comprenderá además que los ácidos nucleicos que codifican una molécula capaz de provocar una respuesta inmune necesariamente codifican un inmunógeno. El artesano comprenderá además que los inmunógenos no se limitan a moléculas de longitud completa, sino que pueden incluir moléculas parciales.

El término "inmunidad pasiva" se refiere a la transferencia de inmunidad de un sujeto a otro a través de la transferencia de anticuerpos. La inmunidad pasiva puede ocurrir naturalmente, como cuando los anticuerpos maternos se transfieren al feto. La inmunidad pasiva también puede ocurrir artificialmente como cuando las composiciones de anticuerpos se administran a sujetos no inmunes. Los donantes y receptores de anticuerpos

pueden ser sujetos humanos o no humanos. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, pueden generarse *in vitro* o *in vivo*, y pueden purificarse, purificarse parcialmente o no purificarse dependiendo de la realización. En algunas realizaciones descritas en este documento, la inmunidad pasiva se confiere a un sujeto que lo necesita mediante la administración de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que reconocen o se unen específicamente a un antígeno particular. En algunas realizaciones, la inmunidad pasiva se confiere a través de la administración de un polinucleótido aislado o recombinante que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce o se une específicamente a un antígeno particular.

En el contexto de esta invención, un "ligando" es un polipéptido. En un aspecto, el término "ligando" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier molécula que se une a un sitio específico en otra molécula. En otras palabras, el ligando confiere la especificidad de la proteína en una reacción con una célula efectora inmune o un anticuerpo a una proteína o ADN a una proteína. En un aspecto, es el sitio del ligando dentro de la proteína que se combina directamente con el sitio de unión complementario en la célula efectora inmune.

Como se usa en este documento, "soporte de fase sólida" o "soporte sólido", usado indistintamente, no se limita a un tipo específico de soporte. Más bien, hay un gran número de soportes disponibles y los conoce un experto en la técnica. Los soportes de fase sólida incluyen geles de sílica, resinas, películas plásticas derivadas, perlas de vidrio, algodón, perlas de plástico, geles de alúmina. Como se usa en el presente documento, "soporte sólido" también incluye matrices, células y liposomas presentadores de antígeno sintéticos. Se puede seleccionar un soporte de fase sólida adecuado en función del uso final deseado y la idoneidad para diversos protocolos. Por ejemplo, para la síntesis de péptidos, el soporte en fase sólida puede referirse a resinas tales como poliestireno (por ejemplo, resina PAM obtenida de Bachem Inc., Península Laboratories, etc.), resina POLYHIPE.RTM. (obtenida de Aminotech, Canadá), resina de poliamida (obtenida de Península Laboratories), resina de poliestireno injertada con polietilenglicol (TentaGel.RTM., Rapp Polymere, Tubingen, Alemania) o resina de polidimetilacrilamida (obtenida de Milligen/Biosearch, California).

Un ejemplo de un soporte en fase sólida incluye vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, gabbros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble hasta cierto punto o insoluble. El material de soporte puede tener prácticamente cualquier configuración estructural posible siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un polinucleótido, polipéptido o anticuerpo. Por lo tanto, la configuración de soporte puede ser esférica, como en una perla, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana, tal como una lámina, una tira de prueba, etc. o, alternativamente, perlas de poliestireno. Los expertos en la técnica conocerán muchos otros portadores adecuados para unir anticuerpos o antígenos, o podrán determinar los mismos mediante el uso de experimentación de rutina.

Modos para llevar a cabo la divulgación

La fibrosis quística (CF) es el trastorno genético hereditario letal más común que afecta a los caucásicos. Incluso con los avances médicos, la CF acorta la vida y los pacientes generalmente sobreviven solo hasta los 38 años. La infección del pulmón por CF por *Burkholderia cenocepacia* (*B. cenocepacia*) presenta desafíos excepcionales para el tratamiento médico de estos pacientes, ya que clínicamente este microbio es resistente a virtualmente todos los antibióticos son altamente transmisibles y la infección de pacientes con CF con este microbio los hace no elegibles para el trasplante de pulmón, a menudo la última opción para salvar vidas. Los inventores se han direccionado a dos componentes abundantes de la biopelícula de *B. cenocepacia* para la intervención inmune: ADN extracelular y proteínas DNABII, las últimas de las cuales son proteínas de unión a ácido nucleico bacteriano. El tratamiento de las biopelículas de *B. cenocepacia* con antisuero dirigido a una de estas proteínas DNABII (factor huésped de integración o IHF) resultó en una interrupción significativa de la biopelícula. Además, cuando la desestabilización mediada por anti-IHF de una biopelícula de *B. cenocepacia* se combinó con la exposición a antibióticos tradicionales, *B. cenocepacia* residente dentro de la biopelícula y, por lo tanto, típicamente altamente resistente a la acción de los antibióticos, ahora se volvió susceptible a la muerte. La incubación previa de *B. cenocepacia* con suero anti-IHF antes de la exposición a macrófagos CF murinos, que normalmente no pueden degradar efectivamente *B. cenocepacia* ingerida, dio como resultado un aumento estadísticamente significativo en la muerte de *B. cenocepacia* fagocitada. Colectivamente, estos hallazgos muestran que direccionar a las proteínas DNABII es un enfoque novedoso para el tratamiento de pacientes con CF, particularmente aquellos cuyos pulmones están infectados con *B. cenocepacia*.

Procedimientos diagnósticos y terapéuticos

Esta divulgación proporciona un procedimiento para inhibir, competir o valorar una biopelícula producida por *Burkholderia*, el procedimiento comprende, o alternativamente que consiste esencialmente en, o aún que consiste en, poner en contacto la biopelícula con una cantidad efectiva de un anticuerpo de factor huésped anti-integración (anti-IHF), inhibiendo, compitiendo o valorando así la biopelícula. El procedimiento puede realizarse *in vitro* o *in vivo*. En un aspecto, el poner en contacto el anticuerpo anti-IHF se realiza en ausencia de un tratamiento con DNasa. En un aspecto, el tratamiento con ADNsa que se excluye de la terapia comprende una enzima que cataliza la escisión de los enlaces fosfodiéster en el esqueleto del ADN. Se sabe que tres ejemplos no limitantes de enzimas DNasa que se excluyen de la terapia se direccionan no solo a las estructuras cruciformes, sino también a una variedad de

estructuras secundarias de ADN que incluyen ADNsa I, T4 EndoVII y T7 Endo I. En un aspecto, el tratamiento con DNasa que está excluido de la terapia comprende, o consiste esencialmente en, o aún además consiste en, Pulmozyme® (dornasa alfa; Genentech, Inc.).

5 En otro aspecto, el procedimiento comprende además, o alternativamente que consiste esencialmente en, o aún además consiste en, poner en contacto la biopelícula o *Burkholderia* con una cantidad efectiva de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de la *Burkholderia* que causa la biopelícula. Ejemplos no limitativos de tales incluyen ampicilina, amoxicilina-clavulanato, ceftazidina, ciprofloxacina, imipenem, minociclina y cefdinir. El contacto puede realizarse *in vitro* in o *in vivo*.

10 También se proporciona en el presente documento un procedimiento para tratar una infección o enfermedad causada por una infección de *Burkholderia*, en un sujeto, que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste en, administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-IHF, por lo tanto tratar la infección o enfermedad causada por la infección de *Burkholderia*.

15 Esta divulgación también proporciona procedimientos para tratar o prevenir la recurrencia de una infección en un paciente con CF que lo necesita, que comprende, o alternativamente, consiste esencialmente en, o aún además consiste en, administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-IHF, tratando o previniendo así la recurrencia de la infección en el paciente con CF.

20 En un aspecto, la administración del anticuerpo anti-IHF es en ausencia de un tratamiento con DNasa. En un aspecto, el tratamiento con ADNsa que se excluye de la terapia comprende una enzima que cataliza la escisión de los enlaces fosfodiéster en el esqueleto del ADN. Tres ejemplos no limitantes de enzimas DNasa que se excluyen de la terapia y se sabe que direccionan no solo las estructuras cruciformes, sino también una variedad de estructuras secundarias de ADN incluyen DNasa I, T4 EndoVII y T7 Endo I. En un aspecto, el tratamiento con DNasa que está excluido de la terapia comprende, o consiste esencialmente en, o aún además consiste en, Pulmozyme® (dornasa alfa; Genentech, Inc.). En un aspecto aún adicional, el procedimiento comprende además, o consiste aún además

25 esencialmente en, o aún además consiste en administrar al sujeto una cantidad efectiva de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento del *Burkholderia* que causa la biopelícula. Ejemplos no limitativos de tales incluyen ampicilina, amoxicilina-clavulanato, ceftazidina, ciprofloxacina, imipenem, minociclina y cefdinir.

En cada uno de los procedimientos descritos anteriormente, ejemplos no limitantes de la *Burkholderia* es *Burkholderia cenocepacia* (*B. cenocepacia*), *B. multivorans*, *B. mallei*, *B. cepaci* o *B. pseudomallei*.

30 El anticuerpo anti-IHF para uso en los procedimientos anteriores es uno o más de un anticuerpo anti-IHF α o anti-IHF β . En un aspecto adicional, el anticuerpo anti-IHF es un anticuerpo IgG. El anticuerpo puede ser cualquiera de los diversos anticuerpos descritos en el presente documento, ejemplos no limitantes de los mismos incluyen un anticuerpo monoclonal de longitud completa, un anticuerpo policlonal, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpo monoclonal humano, un anticuerpo humano recombinante, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo revestido, un diacuerpo, un anticuerpo humanizado, un derivado de anticuerpo, un anticuerpo humanizado recombinante, o un fragmento o un fragmento de unión a antígeno del mismo, siempre que exhiba la actividad biológica deseada. En un aspecto, el fragmento comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o aún además consiste en la CDR del anticuerpo. En un aspecto, el anticuerpo está marcado de forma detectable o comprende además un marcador detectable conjugada a él.

35

40 En el presente documento se describen ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-IHF, y en un aspecto, es uno o más de un anticuerpo que reconoce y se une específicamente a un polipéptido identificado en la Tabla 2, o al fragmento de Arm identificado en el mismo, o un equivalente de tal polipéptido o un polinucleótido o polipéptido que comprende una o más de las secuencias: TCTCAACGATTTA (SEQ ID NO. 341); WATCAANNNTTR (donde W es A o T, N es cualquier nucleótido y R es A o G; (SEQ ID NO. 342); MATITKLDIIEYLSDKYHLS (también denominado en este documento hIFA1; (SEQ ID NO. 343); KYHLSKQDTKNVVENFLEEI (también denominado en este documento como hIFA2; (SEQ ID NO. 344); FLEEIRLSLESGQDVKLSGF (también denominado en el presente documento como hIFA3; (SEQ ID NO. 345); KLSGFNFELRDKSSRPGRN (también denominado en este documento como hIFA4; (SEQ ID NO. 346); RPGRNPKTGDVVPVSARRVV (también denominado en el presente documento como hIFA5; (SEQ ID NO. 347); ARRVVTFKPGQKLRARVEKTK (también denominado en este documento como hIFA6; (SEQ ID NO. 348), o un equivalente del mismo o un polinucleótido o péptido que tiene al menos 60 %, o alternativamente al menos 65 %, o alternativamente al menos 70 %, o alternativamente al menos 75 %, o alternativamente 80 %, o alternativamente al menos 85 %, o alternativamente al menos 90 %, o alternativamente al menos 95 % de identidad a las mismas o para secuencias de polipéptidos, que está codificado por un polinucleótido o su complemento que se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad con un polinucleótido que codifica tales secuencias de polipéptidos. Las condiciones de alta rigurosidad se describen anteriormente y se incorporan aquí como referencia. Los solicitantes han determinado que los aminoácidos en negrita y subrayados están muy conservados y, por lo tanto, en un aspecto, no se modifican ni alteran al designar un polipéptido equivalente. Ejemplos adicionales de polipéptidos equivalentes incluyen, por ejemplo, un polipéptido que consiste en, o que comprende los polipéptidos mencionados anteriormente con la adición de hasta 25, o alternativamente 20, o alternativamente 15, o alternativamente hasta 10, o alternativamente hasta 5 aminoácidos aleatorios en ya sea la amina o carboxi terminales (o en ambos).

55

60

Para estos procedimientos, la infección es *in vivo* y en un huésped mamífero, tal como un paciente humano, por ejemplo, es un huésped mamífero inmaduro o un paciente pediátrico.

5 Esta divulgación también proporciona un procedimiento para inhibir, competir o valorar una biopelícula presente o que contribuye a la CF (por ejemplo, una biopelícula inducida por *B. cenocepacia*), comprendiendo el procedimiento, o alternativamente que consiste esencialmente, o aún además que consiste en, poner en contacto la biopelícula con una agente interferente, inhibiendo, compitiendo o titulando la biopelícula. El contacto puede realizarse *in vitro* o *in vivo*.

10 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para inhibir, prevenir o descomponer una biopelícula microbiana en un paciente con CF o un paciente que alberga una infección que contribuye a la CF, que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste además en poner en contacto la biopelícula con un agente interferente, inhibiendo, previniendo o descomponiendo la biopelícula microbiana. Los pacientes pueden ser animales, mamíferos o un paciente humano.

15 Cuando se practican *in vitro*, los procedimientos son útiles para detectar o confirmar agentes interferentes que tengan la misma capacidad, similar u opuesta que los polipéptidos, polinucleótidos, anticuerpos, células huésped, moléculas pequeñas y composiciones de esta invención. Alternativamente, pueden usarse para identificar cual agente interferente es el más adecuado para tratar una infección microbiana. Por ejemplo, uno puede cribar nuevos agentes o terapias combinadas al tener dos muestras que contienen, por ejemplo, el polipéptido de ADN BII y el ADN o la biopelícula microbiana y el agente a analizar. La segunda muestra contiene el polipéptido de ADN BII y el ADN o la biopelícula microbiana y un agente conocido por ser activo, por ejemplo, un anticuerpo anti-IHF o una molécula pequeña para servir como control positivo. En un aspecto adicional, se proporcionan varias muestras y los agentes interferentes se agregan al sistema en diluciones crecientes para determinar la dosis óptima que probablemente sería efectiva en el tratamiento de un sujeto en el entorno clínico. Como es evidente para los expertos en la técnica, se puede proporcionar un control negativo que contiene el polipéptido de ADN BII y el ADN microbiano o la biopelícula. En un aspecto adicional, el polipéptido de ADN BII y el ADN microbiano o la biopelícula se marcan de manera detectable, por ejemplo, con moléculas luminiscentes que emitirán una señal cuando entren en contacto entre sí. Las muestras están contenidas bajo condiciones similares durante un periodo de tiempo efectivo para que el agente inhiba, compita o valore la interacción entre el polipéptido de ADN BII y el ADN o la biopelícula microbiana y luego se analiza la emisión de señal de las moléculas luminiscentes. Si la muestra emite una señal, entonces el agente no es efectivo para inhibir la unión.

20 En otro aspecto, el procedimiento *in vitro* se practica en un sistema de portaobjetos de cámara miniaturizado en el que el aislado microbiano (tal como un bacteriano) que causa una infección por CF podría aislarse del humano/animal y luego cultivarse para permitir que crezca como una biopelícula *in vitro*. El agente interferente (tal como el anticuerpo anti-IHF) o la posible biopelícula del agente interferente se agrega solo o en combinación con otro agente al cultivo con o sin diluciones crecientes del agente interferente potencial o agente interferente tal como un anti-IHF (u otro anticuerpo, molécula pequeña, agente, etc.) para encontrar la dosis óptima que probablemente sería efectiva en el tratamiento de ese paciente cuando se suministró al sujeto donde existía la infección. Como es evidente para los expertos en la técnica, se puede realizar un control positivo y negativo simultáneamente.

25 En un aspecto adicional, el procedimiento se practica en una plataforma de alto rendimiento con el agente interferente (tal como el anticuerpo anti-IHF) y/o el agente interferente potencial (solo o en combinación con otro agente) en una celda de flujo. El agente interferente (tal como el anticuerpo anti-IHF) o la posible biopelícula del agente interferente se agrega solo o en combinación con otro agente al cultivo con o sin diluciones crecientes del agente interferente potencial o agente interferente tal como un anti-IHF (u otro anticuerpo, molécula pequeña, agente, etc.) para encontrar la dosis óptima que probablemente sería efectiva en el tratamiento de ese paciente cuando se suministró al sujeto donde existía la infección. Los aislamientos de biopelículas se sonicán para separar las bacterias de la biopelícula del polipéptido de ADN BII, tal como el IHF unido al ADN microbiano. Los complejos de polipéptido de ADN BII - ADN se aíslan en virtud de un anticuerpo anti-IHF en la plataforma. El ADN microbiano se libera con por ejemplo un lavado con sal, y se usa para identificar las bacterias de biopelícula agregadas. El ADN liberado se identifica luego, por ejemplo, mediante secuenciación por PCR. Si el ADN no se libera, entonces los agentes interferentes realizaron con éxito o se unieron al ADN microbiano. Si se encuentra ADN en la muestra, entonces el agente no interfirió con la unión de ADN-polipéptido microbiano de ADN BII. Como es evidente para los expertos en la técnica, se puede realizar simultáneamente un control positivo y/o negativo.

30 Los procedimientos anteriores también se pueden usar como una prueba de diagnóstico, ya que es posible que una especie bacteriana dada responda mejor a la reversión de su biopelícula por un agente más que otro, este sistema de análisis rápido de alto rendimiento podría permitir a un experto en la técnica analizar un panel de posibles agentes anti-IHF para identificar a los más eficaces del grupo.

35 La ventaja de estos procedimientos es que la mayoría de los laboratorios clínicos de microbiología en los hospitales ya están equipados para realizar este tipo de ensayos (es decir, la determinación de los valores de MIC, MBC) utilizando bacterias que crecen en cultivo líquido (o planctonicamente). Como es evidente para los expertos en la técnica, las bacterias generalmente no crecen planctonicamente cuando causan enfermedades. En cambio, están creciendo como una biopelícula estable y estas biopelículas son significativamente más resistentes al tratamiento

- 5 con antibióticos, anticuerpos u otras terapias. Esta resistencia es la razón por la cual la mayoría de los valores MIC/MBC no pueden predecir con precisión la eficacia *in vivo*. Por lo tanto, al determinar qué "dosis" de agente podría revertir una biopelícula bacteriana *in vitro* (como se describió anteriormente), el ensayo preclínico de los solicitantes sería un predictor más confiable de la eficacia clínica, incluso como una aplicación de medicina personalizada.
- Además del entorno clínico, los procedimientos se pueden utilizar para identificar y/o confirmar agentes interferentes en un entorno industrial.
- 10 En un aspecto adicional de los procedimientos anteriores, se agrega un antibiótico o antimicrobiano que se sabe que inhibe el crecimiento de la infección subyacente de forma secuencial o concurrente, para determinar si la infección puede inhibirse. También es posible agregar el agente interferente al ADN microbiano o al polipéptido ADN BII antes de agregar el complejo faltante para analizar la inhibición de la biopelícula.
- Cuando se practica *in vivo* en animales no humanos, el procedimiento proporciona un cribado preclínico para identificar agentes interferentes que pueden usarse solos o en combinación con otros agentes para descomponer las biopelículas.
- 15 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para inhibir, prevenir o descomponer una biopelícula microbiana y/o eliminar una infección microbiana en un paciente con CF o un paciente que alberga una infección que contribuye a la CF, que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o aún además que consiste en poner en contacto la biopelícula con un agente interferente, inhibiendo, previniendo o descomponiendo y/o eliminando la infección microbiana o la biopelícula microbiana. El paciente puede ser un animal, mamífero o paciente humano.
- 20 También se proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la recurrencia de una biopelícula en un paciente con CF o un paciente en riesgo de desarrollar una infección que contribuya a la formación de una biopelícula, comprendiendo el procedimiento, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste en administrar al paciente una cantidad efectiva de un agente interferente, tratando o previniendo así la recurrencia de una infección microbiana en el paciente con CF. El paciente con CF puede ser un animal, mamífero o paciente humano.
- 25 También se proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la recurrencia de una infección en una CF en un paciente que lo necesite, que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste además en administrar al paciente una cantidad efectiva de un agente interferente.
- Los agentes interferentes se pueden combinar con antimicrobianos para complementar además la terapia. Por lo tanto, cualquiera de los procedimientos anteriores puede comprender, o consistir esencialmente en, o consistir aún además en la administración o contacto con una cantidad efectiva del antimicrobiano. Ejemplos no limitativos de tales incluyen
- 30 Para el propósito de los procedimientos *in vitro* e *in vivo* mencionados anteriormente, el agente interferente y las composiciones se describen en la Publicación de Patente U.S. Núm. 2011/0236306, en particular los números de párrafo 238-263 y 277-329, se incorporan aquí como referencia.
- 35 En un aspecto adicional, los procedimientos comprenden además, o alternativamente consisten esencialmente en, o aún además consisten en administrar al sujeto una cantidad efectiva de uno o más de un antimicrobiano, un péptido antigénico o un adyuvante.
- Un ejemplo no limitante de un agente antimicrobiano es otro componente de la vacuna, tal como un antígeno de superficie, por ejemplo una proteína Pili tipo IV (véase Jurcisek and Bakaletz (2007) J. of Bacteriology 189 (10): 3868-3875).
- 40 Los agentes y las composiciones de esta invención pueden administrarse de manera simultánea o secuencial entre sí u otros agentes antimicrobianos y/o antígenos de superficie. En un aspecto particular, la administración es localmente al sitio de la infección mediante inyección directa o por inhalación, por ejemplo. Otros ejemplos no limitativos de administración incluyen uno o más procedimientos que comprenden transdérmica, uretral, sublingual, rectal, vaginal, ocular, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, por inhalación u oral.
- 45 Las infecciones y enfermedades microbianas que pueden tratarse mediante los procedimientos de esta invención incluyen infecciones que conducen o están asociadas con infección por CF. Estas infecciones microbianas pueden estar presentes en la vía aérea superior, media e inferior (otitis, sinusitis, bronquitis, pero también exacerbaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), tos crónica, complicaciones y/o causa primaria de fibrosis quística (CF) y neumonía adquirida en la comunidad (CAP). Así, al practicar los procedimientos *in vivo* de esta invención, estas enfermedades y complicaciones de estas infecciones también se pueden prevenir o tratar.
- 50 Por lo tanto, las rutas de administración aplicables a los procedimientos de la invención incluyen la aplicación intranasal, intramuscular, uretral, intratraqueal, subcutánea, intradérmica, tópica, intravenosa, rectal, nasal, oral, inhalación y otras vías de administración enterales y parenterales. Las rutas de administración pueden combinarse, si se desea, o ajustarse dependiendo del agente y/o el efecto deseado. Un agente activo puede administrarse en
- 55

una dosis única o en dosis múltiples. Las realizaciones de estos procedimientos y rutas adecuadas para el suministro incluyen rutas sistémicas o localizadas. En general, las rutas de administración adecuadas para los procedimientos de la invención incluyen, pero no se limitan a, rutas de inyección directa, enteral, parenteral o por inhalación.

- 5 Las rutas de administración parenterales que no sean la administración por inhalación incluyen, entre otras, las rutas tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intraorbital, intracapsular, intraespinal, intraesternal e intravenosa, es decir, cualquier ruta de administración que no sea a través del canal alimentario. La administración parenteral puede llevarse a cabo para efectuar la administración sistémica o local del agente inhibidor. Cuando se desea la administración sistémica, la administración típicamente implica la administración tópica o mucosa invasiva o
10 absorbida sistémicamente de preparaciones farmacéuticas.

Los agentes interferentes de la invención también pueden administrarse al sujeto mediante administración enteral. Las rutas de administración enteral incluyen, pero no se limitan a, suministro oral, uretral y rectal (por ejemplo, usando un supositorio).

- 15 Los procedimientos de administración del principio activo a través de la piel o la mucosa incluyen, pero no se limitan a, la aplicación tópica de una preparación farmacéutica adecuada, transmisión transdérmica, inyección y administración epidérmica. Para la transmisión transdérmica, los promotores de absorción o la iontoforesis son procedimientos adecuados. La transmisión iontoforética se puede lograr utilizando "parches" disponibles comercialmente que suministran su producto continuamente a través de pulsos eléctricos a través de la piel intacta durante periodos de varios días o más.

- 20 En diversas realizaciones de los procedimientos de la invención, el agente interferente se administrará por inhalación, inyección u oral de forma continua, diariamente, al menos una vez al día (QD), y en diversas realizaciones dos (BID), tres (TID), o incluso cuatro veces al día. Típicamente, la dosis diaria terapéuticamente efectiva será de al menos aproximadamente 1 mg, o al menos aproximadamente 10 mg, o al menos aproximadamente 100 mg, o aproximadamente 200 - aproximadamente 500 mg, y algunas veces, dependiendo del compuesto, hasta tanto como aproximadamente 1 g a aproximadamente 2,5 g.
25

La dosificación puede realizarse de acuerdo con los procedimientos de la invención usando cápsulas, comprimidos, suspensión oral, suspensión para inyección intramuscular, suspensión para infusión intravenosa, gel o crema para aplicación tópica, o suspensión para inyección intraarticular.

- 30 La dosificación, la toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones descritas en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD50/ED50. Se prefieren las composiciones que exhiben altos índices terapéuticos. Si bien se pueden usar compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado al diseñar un sistema de administración que direcciona tales compuestos al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.
35

- Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en los procedimientos, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración en plasma circulante que incluya la IC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba la cual logra una inhibición de síntomas medio máxima) como se determina en el cultivo celular. Tal información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.
40
45

- En algunas realizaciones, una cantidad efectiva de una composición suficiente para lograr un efecto terapéutico o profiláctico, varía de aproximadamente 0,000001 mg por kilogramo de peso corporal por administración a aproximadamente 10.000 mg por kilogramo de peso corporal por administración. De manera adecuada, los intervalos de dosificación son de aproximadamente 0,0001 mg por kilogramo de peso corporal por administración a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal por administración. La administración se puede proporcionar como una dosis inicial, seguida de una o más dosis "de refuerzo". Las dosis de refuerzo pueden administrarse un día, dos días, tres días, una semana, dos semanas, tres semanas, uno, dos, tres, seis o doce meses después de una dosis inicial. En algunas realizaciones, se administra una dosis de refuerzo después de una evaluación de la respuesta del sujeto a administraciones anteriores.
50
55

El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y el tiempo necesarios para tratar eficazmente a un sujeto, que incluyen, pero no se limitan a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el

tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de las composiciones terapéuticas descritas en el presente documento puede incluir un tratamiento único o una serie de tratamientos.

Las composiciones y procedimientos relacionados de la presente invención pueden usarse en combinación con la administración de otras terapias. Estos incluyen, entre otros, la administración de enzimas DNasa, antibióticos, antimicrobianos u otros anticuerpos.

Los procedimientos y composiciones divulgados en este documento pueden incluir una enzima desoxirribonucleasa (DNasa) que actúa sinérgicamente con el anticuerpo anti-DNABII. Una DNasa es cualquier enzima que cataliza la escisión de los enlaces fosfodiéster en el esqueleto del ADN. Tres ejemplos no limitantes de enzimas DNasa que se sabe que atacan no solo las estructuras cruciformes, sino también una variedad de estructuras secundarias de ADN incluyen ADNsa I, T4 EndoVII y T7 Endo I. En ciertas realizaciones, la cantidad efectiva de anticuerpo anti-DNABII necesario para desestabilizar la biopelícula se reduce cuando se combina con una DNasa. Cuando se administra *in vitro*, la DNasa se puede agregar directamente al ensayo o en un tampón adecuado que se sabe que estabiliza la enzima. La dosis unitaria efectiva de DNasa y las condiciones del ensayo pueden variar y pueden optimizarse de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica.

Los procedimientos y composiciones divulgados en este documento pueden combinarse con antibióticos y/o antimicrobianos. Los antimicrobianos son sustancias que matan o inhiben el crecimiento de microorganismos tales como bacterias, hongos o protozoos. Aunque las biopelículas son generalmente resistentes a las acciones de los antibióticos, las composiciones y procedimientos descritos en este documento pueden usarse para sensibilizar la infección que implica una biopelícula a los procedimientos terapéuticos tradicionales para tratar infecciones. En otras realizaciones, el uso de antibióticos o antimicrobianos en combinación con los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria permite la reducción de la cantidad efectiva del agente antimicrobiano y/o reductor de biopelículas. Algunos ejemplos no limitantes de antimicrobianos y antibióticos útiles en combinación con los procedimientos de la presente invención incluyen amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, cefdinir, azitromicina y sulfametoxazol-trimetoprima. La dosis terapéuticamente efectiva del antimicrobiano y/o antibiótico en combinación con el agente reductor de biopelícula se puede determinar fácilmente mediante procedimientos tradicionales. En algunas realizaciones, la dosis del agente antimicrobiano en combinación con el agente reductor de biopelícula es la dosis efectiva promedio la cual se ha demostrado que es efectiva en otras infecciones bacterianas, por ejemplo, infecciones bacterianas en las que la etiología de la infección no incluye una biopelícula. En otras realizaciones, la dosis es 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0 o 5 veces la dosis efectiva promedio. El antibiótico o antimicrobiano se puede agregar antes, simultáneamente o después de la adición del anticuerpo anti-DNABII.

Los procedimientos y composiciones divulgados en este documento pueden combinarse con anticuerpos que tratan la infección bacteriana. Un ejemplo de un anticuerpo útil en combinación con los procedimientos y composiciones descritos en este documento es un anticuerpo dirigido contra una proteína de membrana externa no relacionada (es decir, OMP P5). El tratamiento con este anticuerpo solo no reduce el volumen de una biopelícula *in vitro*. La terapia combinada con este anticuerpo y un agente reductor de biopelícula y/o un antimicrobiano da como resultado un efecto mayor que el que podría lograrse con cualquiera de los reactivos utilizados solos a la misma concentración. Otros anticuerpos que pueden producir un efecto sinérgico cuando se combinan con un agente reductor de biopelículas o procedimientos para reducir una biopelícula incluyen preparaciones anti-rsPiiA anti-OMP26, anti-OMP P2 y anti-OMP completo.

Las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento se pueden usar para sensibilizar la infección bacteriana que implica una biopelícula a modalidades terapéuticas comunes efectivas en el tratamiento de infecciones bacterianas sin una biopelícula, pero por lo demás son ineficaces en el tratamiento de infecciones bacterianas que implican una biopelícula. En otras realizaciones, las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento pueden usarse en combinación con modalidades terapéuticas que son efectivas en el tratamiento de infecciones bacterianas que implican una biopelícula, pero la combinación de dicha terapia adicional y agente o procedimiento reductor de biopelícula produce un efecto sinérgico de tal manera que la dosis efectiva de cualquiera de l agente reductor de biopelícula o del agente terapéutico adicional se puede reducir. En otros casos, la combinación de tal terapia adicional y el agente o procedimiento reductor de biopelículas produce un efecto sinérgico de tal manera que se mejora el tratamiento. Una mejora del tratamiento se puede evidenciar por una menor cantidad de tiempo requerido para tratar la infección.

El tratamiento terapéutico adicional se puede agregar antes, simultáneamente o después de los procedimientos o composiciones utilizados para reducir la biopelícula, y puede estar contenido dentro de la misma formación o como una formulación separada.

Kits

Los kits que contienen los agentes y las instrucciones necesarias para realizar los procedimientos *in vitro* e *in vivo* también se divulgan en este documento. En consecuencia, la divulgación proporciona kits para realizar estos procedimientos, así como instrucciones para llevar a cabo los procedimientos de esta invención, tales como recolectar tejido y/o realizar el cribado, y/o analizar los resultados, y/o la administración de una cantidad efectiva de

agente interferente como se define en el presente documento. Estos pueden usarse solos o en combinación con otros agentes antimicrobianos adecuados.

Por ejemplo, un kit puede comprender, o alternativamente, consistir esencialmente en, o aún además consistir en uno o más agentes del grupo de un polipéptido, polinucleótido o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos del factor huésped de integración aislado o recombinante (IHF); un polipéptido de proteína aislado o recombinante identificado en la Tabla 1, Tabla 2, los fragmentos de Arm identificados en la Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4, un péptido de unión a ADN identificado en la FIG. 9, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos; un polinucleótido o polipéptido aislado o recombinante de la SEQ ID NO. 1 a 33 o 341 a 348, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos; un polipéptido C-terminal aislado o recombinante de la SEQ NO.6 a 11, 28, 29 o los identificados en la Tabla 1, Tabla 4 o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos; un polipéptido que compite con un factor huésped de integración en la unión a un ADN microbiano; un polinucleótido de unión de cuatro vías que se asemeja a una unión de Holliday, un polinucleótido de unión de 3 vías que se asemeja a una horquilla de replicación, un polinucleótido que tiene flexibilidad inherente o polinucleótido doblado; un polinucleótido aislado o recombinante que codifica cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente; un anticuerpo que reconoce o se une específicamente a cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente, o un equivalente o fragmento del mismo; o una molécula pequeña que compite con la unión de una proteína o polipéptido DNABII a un ADN microbiano, y las instrucciones de uso. El kit puede comprender además uno o más de un adyuvante, un péptido antigénico o un antimicrobiano. Ejemplos de vehículos incluyen un vehículo líquido, un vehículo farmacéuticamente aceptable, un vehículo en fase sólida, un vehículo farmacéuticamente aceptable, un polímero farmacéuticamente aceptable, un liposoma, una micela, un implante, una cánula, una pasta, un gel, un implante dental, o un implante médico.

Polipéptidos

También se proporcionan en el presente documento agentes y composiciones interferentes de polipéptidos para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento, en los que el agente interferente es del grupo:

- (a) un polipéptido del factor huésped de integración aislado o recombinante (IHF) o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;
- (b) una proteína similar a histona aislada o recombinante del polipéptido de la cepa U93 de *E. coli* (HU) o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;
- (c) un polipéptido de proteína aislado o recombinante identificado en la Tabla 1, Tabla 2, un polipéptido que comprende o que consiste en los fragmentos de Arm identificados en la Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4 o un péptido de unión a ADN identificado en la FIG. 9, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;
- (d) un polipéptido aislado o recombinante de la SEQ ID NO. 1 a 348, o un fragmento o un equivalente del mismo;
- (e) un polipéptido C-terminal aislado o recombinante de la SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29, 42 a 100, la Tabla 1 o aquellos polipéptidos C-terminales identificados en la Tabla 4 o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos; o
- (f) un polipéptido o polinucleótido que compite con un factor huésped de integración en la unión a un ADN microbiano.

En un aspecto particular, el agente interferente es un polipéptido DNABII aislado o recombinante o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos. Ejemplos no limitativos de tales son un polipéptido alfa o beta IHF o HU; un polipéptido alfa IHF; *Moraxella catarrhalis* HU; *E. coli* HupA, HupB, himA, himD; *E. faecalis* HU (tal como V583), HMGB1 y los identificados en la Tabla 1.

En otro aspecto, el agente interferente es un polipéptido aislado o recombinante que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO. 1 a 5 o 12 a 27, 30 a 35, 101-340 o un péptido de unión a ADN identificado en la FIG. 9)

En otro aspecto, el polipéptido aislado o recombinante comprende, o alternativamente, consiste esencialmente o aún además consiste en la SEQ ID NO. 1 o 2, con la condición de que el polipéptido no sea ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29 o 42 a 100.

En otro aspecto, el polipéptido aislado o recombinante comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o aún además consiste en la SEQ ID NO. 3, 4 o 5, con la condición de que el polipéptido no sea ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29 o 42 a 100.

En otro aspecto, el polipéptido aislado o recombinante comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o aún además consiste en la SEQ ID NO. 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30 o 32, con la condición de que el polipéptido no pertenezca a la SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29 o 42 a 100.

ES 2 746 971 T3

En otro aspecto, el polipéptido aislado o recombinante comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o aún además consiste en la SEQ ID NO. 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 31 33, 34, o 35 con la condición de que el polipéptido no sea ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29 o 42 a 100.

5 En otro aspecto, el polipéptido aislado o recombinante comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o aún además consiste en un polipéptido aislado o recombinante del grupo de:

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 12 y 13;

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 14 y 15;

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 16 y 17;

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 18 y 19;

10 un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 20 y 21;

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 23 y 24;

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 25 y 26;

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 30 y 31;

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 32 y 33;

15 un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 34 y 35;

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 337 y 338; o

un polipéptido que comprende la SEQ ID NO. 339 y 340;

con la condición de que el polipéptido no sea de tipo silvestre de ninguno de IHF alfa, IHF beta o SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100.

20 En otro aspecto, el polipéptido aislado o recombinante es del grupo:

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 12 y 13;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 14 y 15;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 16 y 17;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 18 y 19;

25 un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 20 y 21;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 23 y 24;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 25 y 26;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 30 y 31;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 32 y 33;

30 un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 34 y 35;

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 337 y 338; o

un polipéptido que consiste esencialmente en la SEQ ID NO. 339 y 340;

con la condición de que el polipéptido no sea de tipo silvestre de ninguno de IHF alfa, IHF beta o SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100.

35 También se proporciona en el presente documento un polinucleótido o polipéptido aislado que comprende una o más de las secuencias: TCTCAACGATTTA (SEQ ID NO. 341); WATCAANNNTTR (donde W es A o T, N es cualquier nucleótido y R es A o G; (SEQ ID NO. 342); MATIT**KLDIIEYLS**DKYHLS (también denominado en este documento como hIFA1; (SEQ ID NO. 343); KYHLSKQDTKNV**ENFLEEI** (también denominado en este documento como hIFA2; (SEQ ID NO. 344); **FLEEIRLSLESGQDVKLSGF** (también denominado en este documento como hIFA3; (SEQ ID NO. 345); **KLSGFGN**FELRDKSS**RPGRN** (también denominado en este documento como hIFA4;

(SEQ ID NO. 346); **RPGRNPKTGDVVPVSARRVV** (también denominado en este documento como hIFA5; (SEQ ID NO. 347); **ARRVVTFKPGQKLRARVEKTK** (también denominado en este documento como hIFA6; (SEQ ID NO. 348), o un equivalente del mismo o un polinucleótido o péptido que tiene al menos 60 %, o alternativamente al menos 65 %, o alternativamente al menos 70 %, o alternativamente al menos 75 %, o alternativamente al menos 80 %, o alternativamente al menos 85 %, o alternativamente al menos 90 %, o alternativamente al menos 95 % de identidad a las mismas o para secuencias de polipéptidos, que está codificado por un polinucleótido o su complemento que se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad a un polinucleótido que codifica tales secuencias de polipéptidos. Las condiciones de alta rigurosidad se describen anteriormente y se incorporan aquí como referencia. Los solicitantes han determinado que los aminoácidos en negrita y subrayados están muy conservados y, por lo tanto, en un aspecto, no se modifican ni alteran al designar un polipéptido equivalente. Ejemplos adicionales de polipéptidos equivalentes incluyen, por ejemplo, un polipéptido que consiste en o que comprende los polipéptidos mencionados anteriormente con la adición de hasta 25, o alternativamente 20, o alternativamente 15, o alternativamente hasta 10, o alternativamente hasta 5 aminoácidos aleatorios en ya sea la amina o el terminal carboxi (o en ambos). En un aspecto, el polipéptido aislado se combina con uno o más de un marcador detectable, un vehículo tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable o un adyuvante.

Además, como agentes para usar en los procedimientos de esta invención, se proporcionan fragmentos o un equivalente de los polipéptidos aislados o recombinantes descritos anteriormente. Un ejemplo de un fragmento es un polipéptido C-terminal. En un aspecto adicional, el polipéptido aislado o recombinante comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o aún además consiste en dos o más de los polipéptidos aislados o recombinantes descritos anteriormente.

Por ejemplo, el polipéptido aislado o recombinante comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o aún además consiste en una cualquiera de la SEQ ID. NO. 1 a 5, 12 a 27 o 30 a 33, o un fragmento o un polipéptido equivalente, cuyos ejemplos se identifican en la Tabla 1 o se muestran en la Tabla 2 o el fragmento de Arm identificado en la Tabla 2, Tabla 3 o Tabla 4. En uno aspecto, los polipéptidos de tipo silvestre aislados están excluidos, es decir, que el polipéptido no es ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29, o una secuencia de tipo silvestre identificada en la Tabla 1 o mostrada en la Tabla 2.

En un aspecto, esta divulgación proporciona un polipéptido aislado o recombinante que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos del grupo SEQ ID. NO. 1 a 5, 12 a 27 o 30 a 35, 1 a 6 y 13 a 35, o un polipéptido que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste además en un aminoácido correspondiente a los fragmentos .beta.-3 y/o .alfa.-3 de un *Haemophilus influenzae* IHF α o IHF β , cuyos ejemplos no limitantes incluyen la SEQ ID NO. 12 a 27, o un fragmento o equivalente de cada uno de los mismos. En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste además en una secuencia de aminoácidos del grupo SEQ ID NO. 1 a 4, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos, o un polipéptido que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste además en un aminoácido correspondiente a los fragmentos beta-3 y/o alfa-3 de un *Haemophilus influenzae* IHF.alpha. o IHF.beta., cuyos ejemplos no limitantes incluyen la SEQ ID NO. 12 a 27 o un fragmento o un equivalente biológico del mismo que comprende además independientemente al menos 2, o alternativamente al menos 3, o alternativamente al menos 4, o alternativamente al menos 5, o al menos 6, o alternativamente al menos 7, o alternativamente al menos 8, o alternativamente al menos 9 o alternativamente al menos 10 aminoácidos en el terminal amino y/o carboxilo del polipéptido. En un aspecto, se excluyen los polipéptidos de unión a ADN de tipo silvestre aislados, es decir, que el polipéptido no es ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29 o 42 a 100 o una secuencia de polipéptidos de tipo silvestre aislada enumerada en la Tabla 1 o mostrada en la Tabla 2.

En otro aspecto, esta divulgación proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternativamente, que consiste esencialmente en, o aún además, que consiste en la SEQ ID. NO 1 o 2 sola o en combinación con un polipéptido que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente en, o que consiste aún además en un aminoácido correspondiente a los fragmentos beta-3 y/o alfa-3 de un *Haemophilus influenzae* IHF- α o IHF.beta., cuyos ejemplos limitantes incluyen la SEQ ID Nos. 12 a 27 o un fragmento o un equivalente biológico de cada uno de los mismos. En un aspecto, se excluyen los polipéptidos de unión a ADN de tipo silvestre aislados, es decir, que el polipéptido no es ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29 o 42 a 100 o una secuencia de polipéptidos aislada enumerada en la Tabla 1 o mostrada en la Tabla 2.

En aún un aspecto adicional, esta divulgación proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste aún además, de la SEQ ID NO. 3 o 4 o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos solo o en combinación con un polipéptido que comprende, o alternativamente que consiste esencialmente en, o que consiste además en un aminoácido correspondiente a los fragmentos beta-3 y/o alfa-3 de un *Haemophilus influenzae* IHF- α o IHF.beta., cuyos ejemplos no limitantes incluyen la SEQ ID NO. 12 a 27, y 34-35 o un equivalente biológico de cada uno de los mismos. En un aspecto, se excluyen los polipéptidos de unión a ADN de tipo silvestre aislados, es decir, que el polipéptido no es ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11, 28, 29 o 42 a 100 o una secuencia de polipéptidos de tipo silvestre aislada enumerada en la Tabla 1 o mostrada en la Tabla 2.

Esta divulgación también proporciona polipéptidos aislados o recombinantes que comprenden o que consisten alternativamente esencialmente en, o aún además, consisten en dos o más, o tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o más, doce o más, trece o más de los catorce polipéptidos aislados o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos. Ejemplos de tales incluyen polipéptidos aislados o recombinantes que comprenden la SEQ ID NO. 1 a 4, por ejemplo, SEQ ID NO. 1 y 2, o alternativamente 1 y 3 o alternativamente 1 y 4, o alternativamente 2 y 3, o alternativamente SEQ ID NO. 1, 2 y 3 o alternativamente, 2, 3 y 4, o alternativamente 1, 3 y 4. Los polipéptidos pueden estar en cualquier orientación, por ejemplo, SEQ ID NO. 1, 2 y 3 o SEQ ID NO. 3, 2 y 1 o alternativamente 2, 1 y 3, o alternativamente, 3, 1 y 2. Los equivalentes biológicos de estos polipéptidos se incluyen adicionalmente en esta invención con la condición de que las secuencias no incluyan secuencias de tipo silvestre aisladas tal como las identificadas en Tablas 1, 2 y 3.

En otro aspecto, esta divulgación proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende o alternativamente que consiste esencialmente, o aún además, que consiste en la SEQ ID NO. 1 o 2 y 3 o 4, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos, con la condición de que el polipéptido no sea ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11, y pueden comprender además uno o más de los la SEQ ID NO: 11 a 26, por ejemplo, 11 y 12, o alternativamente 1 y 11, o alternativamente 2 y 11, o alternativamente, 1 y 12, o alternativamente 2 y 12, o alternativamente 11, 12 y 1, o alternativamente 2, 11 y 12. En este ejemplo, la SEQ ID NO. 1 o 2 se encuentra corriente arriba o en el terminal amino de la SEQ ID NO. 3 o 4, con la condición de que la secuencia de aminoácidos no sea un polipéptido de tipo silvestre aislado, por ejemplo, ninguno de la SEQ ID NO. 6 a 11, 28 y 29. En otro aspecto, el polipéptido aislado comprende la SEQ ID NO. 3 o 4 ubicados corriente arriba o en el terminal amino de la SEQ ID NO. 1 o 2. Los equivalentes biológicos de estos polipéptidos se incluyen adicionalmente en esta divulgación con la condición de que la secuencia no incluya polipéptidos de tipo silvestre aislados.

En cualquiera de los ejemplos anteriores, se puede agregar un enlazador peptídico al N-terminal o al C-terminal del polipéptido. Un "enlazador" o "enlazador peptídico" se refiere a una secuencia peptídica enlazada al N-terminal o al C-terminal de una secuencia polipeptídica. En un aspecto, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 residuos de aminoácidos o, alternativamente, de 2 a aproximadamente 10, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 residuos de aminoácidos de longitud. Un ejemplo de un enlazador peptídico es Gly-Pro-Ser-Leu-Lys-Leu (SEQ ID NO: 37). Otros ejemplos incluyen Gly-Gly-Gly; Gly-Pro-Ser-Leu (SEQ ID NO: 38); Gly-Pro-Ser; Pro-Ser-Leu-Lys (SEQ ID No: 39); Gly-Pro-Ser-Leu-Lys (SEQ ID NO: 40) y Ser-Leu-Lys-Leu (SEQ ID NO: 41).

Los polipéptidos aislados divulgados en este documento pretenden incluir polipéptidos y proteínas de tipo silvestre aislados y producidos de forma recombinante a partir de células huésped procariontas y eucariotas, así como muteínas, análogos y fragmentos de los mismos, ejemplos de tales células se describen anteriormente. En algunas realizaciones, el término también incluye anticuerpos y anticuerpos antiidiotípicos como se describe en el presente documento. Tales polipéptidos pueden aislarse o producirse usando los procedimientos conocidos en la técnica y descritos brevemente aquí.

En un aspecto aún adicional, los polipéptidos están conjugados o enlazados a un marcador detectable. Los marcadores adecuados son conocidas en la técnica y se describen en este documento.

En un aspecto aún adicional, los polipéptidos con o sin un marcador detectable pueden estar contenidos o expresados en la superficie de una célula huésped procarionta o eucariota huésped, tal como una célula dendrítica.

Las proteínas y los polipéptidos se pueden obtener mediante una serie de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, los cuales incluyen purificación, síntesis química y procedimientos recombinantes. Los polipéptidos pueden aislarse de preparaciones tales como sistemas de células huésped mediante procedimientos tales como inmunoprecipitación con anticuerpo y técnicas estándar tales como filtración en gel, intercambio iónico, fase reversa y cromatografía de afinidad. Para tal metodología, véase por ejemplo Deutscher et al. (1999) Guide To Protein Purification: Methods In Enzymology (Vol. 182, Academic Press). Por consiguiente, esta invención también proporciona los procedimientos para obtener estos polipéptidos, así como los productos obtenibles y obtenidos por estos procedimientos.

Los polipéptidos también se pueden obtener mediante síntesis química usando un sintetizador de péptidos automatizado disponible comercialmente, tal como los fabricados por Perkin/Elmer/Applied Biosystems, Inc., Modelo 430A o 431A, Foster City, California, USA. El polipéptido sintetizado puede precipitarse y purificarse adicionalmente, por ejemplo mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC). Por consiguiente, también se puede usar un procedimiento para sintetizar químicamente las proteínas de esta invención proporcionando la secuencia de la proteína y los reactivos, tales como aminoácidos y enzimas, y enlazando los aminoácidos en la orientación y secuencia lineal adecuadas.

Alternativamente, las proteínas y polipéptidos pueden obtenerse por procedimientos recombinantes bien conocidos como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al. (1989) supra, usando una célula huésped y sistemas de vectores descritos en este documento.

Esta aplicación también proporciona los polipéptidos descritos en el presente documento conjugados con un agente detectable para su uso en los procedimientos de diagnóstico. Por ejemplo, los polipéptidos marcados de forma detectable pueden unirse a una columna y usarse para la detección y purificación de anticuerpos. También son útiles como inmunógenos para la producción de anticuerpos como se describe a continuación. Los polipéptidos de esta invención también se pueden usar en un sistema de ensayo *in vitro* para detectar agentes o fármacos, los cuales modulan los procedimientos celulares.

Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen glicina y los isómeros ópticos D o L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina comúnmente oligopéptido si la cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga, el péptido se denomina comúnmente polipéptido o proteína.

Los péptidos de la invención pueden modificarse para incluir aminoácidos no naturales. Por lo tanto, los péptidos pueden comprender D-aminoácidos, una combinación de D y L-aminoácidos, y diversos aminoácidos "de diseño" (por ejemplo, beta-metil aminoácidos, C- α -metil aminoácidos y N- α -metil aminoácidos, etc.) para transportar propiedades especiales a los péptidos. Además, al asignar aminoácidos específicos en etapas de acoplamiento específicos, se pueden generar péptidos con α -hélices, giros, β -láminas, γ -giros, y péptidos cíclicos. Generalmente, se cree que se prefiere la estructura secundaria α -helicoidal o la estructura secundaria aleatoria.

Los polipéptidos de esta invención también se pueden combinar con diversos portadores en fase sólida, tal como un implante, una cánula, una pasta, un gel, un implante dental o un implante médico o portadores en fase líquida, tal como perlas, soluciones estériles o acuosas, vehículos farmacéuticamente aceptables, polímeros farmacéuticamente aceptables, liposomas, micelas, suspensiones y emulsiones. Ejemplos de disolventes no acuosos incluyen propilenglicol, polietilenglicol y aceites vegetales. Cuando se usa para preparar anticuerpos o inducir una respuesta inmune *in vivo*, los portadores también pueden incluir un adyuvante que es útil para aumentar de manera no específica una respuesta inmune específica. Un artesano experto puede determinar fácilmente si se requiere un adyuvante y seleccionar uno. Sin embargo, solo con fines ilustrativos, los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, sales minerales y polinucleótidos completos e incompletos de Freund. Otros adyuvantes adecuados incluyen monofosforil lípido A (MPL), derivados mutantes de la enterotoxina lábil al calor de *E. coli*, derivados mutantes de toxina del cólera, oligonucleótidos de CPG y adyuvantes derivados del escualeno.

Esta divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende o alternativamente que consiste esencialmente, o que consiste además en, cualquiera de un polipéptido, análogo, muteína o fragmento de esta invención, solo o en combinación entre sí u otros agentes, tales como antibióticos y un portador aceptable o un soporte sólido. Estas composiciones son útiles para diversos procedimientos de diagnóstico y terapéuticos como se describe en el presente documento.

Polinucleótidos

Esta divulgación también proporciona polinucleótidos aislados o recombinantes que codifican uno o más de los polipéptidos aislados o recombinantes identificados anteriormente y sus respectivas cadenas complementarias. Los vectores que comprenden los polinucleótidos aislados o recombinantes se proporcionan además cuyos ejemplos se conocen en la técnica y se describen brevemente aquí. En un aspecto donde se va a expresar más de un polinucleótido aislado o recombinante como una sola unidad, los polinucleótidos aislados o recombinantes pueden estar contenidos dentro de un vector policistrónico. Los polinucleótidos pueden ser ADN, ARN, ARNm o ARN interferente, tal como ARNsi, miARN o ARNbc.

En otro aspecto, esta divulgación proporciona un agente interferente que es un polinucleótido de unión de cuatro vías que se asemeja a una unión de Holliday, un polinucleótido de unión de 3 vías que se asemeja a una horquilla de replicación, un polinucleótido que tiene flexibilidad inherente o polinucleótido doblado que puede tratar o inhibir el polinucleótido de ADN BII de unirse al ADN microbiano, así como tratar, prevenir o inhibir la formación de biopelículas y las infecciones y trastornos asociados. Un experto en la técnica puede elaborar tales polinucleótidos utilizando la información proporcionada en este documento y el conocimiento de los expertos en la técnica. Véase Goodman and Kay (1999) *J. Biological Chem.* 274(52):37004-37011 and Kamashev and Rouviere-Yaniv (2000) *EMBO J.* 19(23):6527-6535.

La divulgación proporciona además el polinucleótido aislado o recombinante enlazado operativamente a un promotor de la transcripción de ARN, así como otras secuencias reguladoras para la replicación y/o expresión transitoria o estable del ADN o ARN. Como se usa en el presente documento, el término "enlazado operativamente" significa colocado de tal manera que el promotor dirigirá la transcripción del ARN fuera de la molécula de ADN. Ejemplos de tales promotores son SP6, T4 y T7. En ciertas realizaciones, los promotores específicos de células se usan para la expresión específica de células del polinucleótido insertado. Los vectores que contienen un promotor o un promotor/potenciador, con codones de terminación y secuencias marcadoras seleccionables, así como un sitio de clonación en el cual una pieza insertada de ADN puede enlazarse operativamente a ese promotor son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Para la metodología general y las estrategias de clonación, véase *Gene Expression Technology* (Goeddel ed., Academic Press, Inc. (1991)) y las referencias citadas allí y *Vectors: Essential Data Series* (Gaceta y Ramji, eds., John Wiley & Sons, NY (1994)) que contiene mapas, propiedades

funcionales, proveedores comerciales y una referencia a los números de acceso GenEMBL para diversos vectores adecuados.

5 Un polinucleótido derivado de los polinucleótidos de la invención puede codificar polipéptidos o proteínas que tienen utilidades diagnósticas y terapéuticas como se describe aquí, así como sondas para identificar transcripciones de la proteína que pueden o no estar presentes. Estos fragmentos de ácido nucleico pueden prepararse, por ejemplo, mediante digestión con enzimas de restricción de polinucleótidos más grandes y luego marcarse con un marcador detectable. Alternativamente, se pueden generar fragmentos aleatorios usando la traducción en muesca de la molécula. Para la metodología para la preparación y marcado de tales fragmentos, véase Sambrook, et al. (1989) supra.

10 Los vectores de expresión que contienen estos ácidos nucleicos son útiles para obtener sistemas de vectores huésped para producir proteínas y polipéptidos. Está implícito que estos vectores de expresión deben ser replicables en los organismos huéspedes como episomas o como parte integral del ADN cromosómico. Ejemplos no limitantes de vectores de expresión adecuados incluyen plásmidos, vectores de levadura, vectores virales y liposomas. Los vectores adenovirales son particularmente útiles para introducir genes en tejidos *in vivo* debido a sus altos niveles de expresión y transformación eficiente de células tanto *in vitro* como *in vivo*. Cuando se inserta un ácido nucleico en una célula huésped adecuada, por ejemplo, una célula procariota o eucariota y la célula huésped se replica, la proteína se puede producir de forma recombinante. Las células huésped adecuadas dependerán del vector y pueden incluir células de mamífero, células animales, células humanas, células de simio, células de insecto, células de levadura y células bacterianas construidas usando procedimientos conocidos. Ver Sambrook, et al. (1989) supra.

15 Además del uso del vector viral para la inserción de ácido nucleico exógeno en las células, el ácido nucleico puede insertarse en la célula huésped mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como la transformación de células bacterianas; transfección usando precipitación con fosfato de calcio para células de mamífero; o DEAE-dextrano; electroporación o microinyección. Véase, Sambrook et al. (1989) supra, para metodología. Por lo tanto, esta invención también proporciona una célula huésped, por ejemplo una célula de mamífero, una célula animal (rata o ratón), una célula humana o una célula procariota tal como una célula bacteriana, que contiene un polinucleótido que codifica una proteína o polipéptido o anticuerpo.

20

25

30 Cuando los vectores se usan para terapia génica *in vivo* o *ex vivo*, se prefiere un vector farmacéuticamente aceptable, tal como un vector retroviral o adenoviral incompetente en la replicación. Los vectores farmacéuticamente aceptables que contienen los ácidos nucleicos de esta invención pueden modificarse adicionalmente para la expresión transitoria o estable del polinucleótido insertado. Como se usa en el presente documento, el término "vector farmacéuticamente aceptable" incluye, pero no se limita a, un vector o vehículo de suministro que tiene la capacidad de direccionarse selectivamente e introducir el ácido nucleico en las células en división. Un ejemplo de tal vector es un vector "incompetente en la replicación" definido por su incapacidad para producir proteínas virales, lo que impide la propagación del vector en la célula huésped infectada. Un ejemplo de un vector retroviral incompetente en la replicación es LNL6 (Miller et al. (1989) BioTechniques 7: 980-990). Se ha establecido la metodología del uso de retrovirus incompetentes en la replicación para la transferencia génica mediada por retrovirus de marcadores génicos. (Bordignon (1989) PNAS USA 86: 8912-8952; Culver (1991) PNAS USA 88: 3155; y Rill (1991) Blood 79 (10): 2694-2700).

35

40 Se pueden generar células genéticamente modificadas que contienen y/o expresan los polinucleótidos de esta invención. Las células genéticamente modificadas se pueden producir mediante la inserción de secuencias reguladoras corriente arriba, tales como promotores o activadores de genes (véase, Patente U.S. No. 5.733.761).

45 Los polinucleótidos pueden conjugarse con un marcador detectable, por ejemplo, un marcador enzimático o un radioisótopo para la detección de ácido nucleico y/o la expresión del gen en una célula. Se conoce una amplia variedad de marcadores detectables apropiados en la técnica, incluidos ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros, tales como avidina/biotina, los cuales son capaces de dar una señal detectable. En un aspecto, es probable desear emplear un marcador fluorescente o un etiqueta enzimática, tal como ureasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa, en lugar de reactivos radioactivos u otros reactivos no deseables para el medio ambiente. En el caso de las etiquetas enzimáticas, se pueden emplear sustratos indicadores calorimétricos para proporcionar un medio visible al ojo humano o espectrofotométricamente, para identificar la hibridación específica con muestras complementarias que contienen ácido nucleico. Por lo tanto, esta invención proporciona además un procedimiento para detectar un polinucleótido monocatenario o su complemento, poniendo en contacto el polinucleótido monocatenario objetivo con un polinucleótido monocatenario marcado (una sonda) que es una parte del polinucleótido de esta invención bajo condiciones que permiten la hibridación (preferiblemente condiciones de hibridación moderadamente estrictas) de polinucleótidos monocatenarios complementarios, o más preferiblemente, bajo condiciones de hibridación altamente estrictas. Los pares de polinucleótidos hibridados se separan de los polinucleótidos monocatenarios no hibridados. Los pares de polinucleótidos hibridados se detectan utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica y se exponen, por ejemplo, en Sambrook et al. (1989) supra.

50

55

60 El polinucleótido realizado en esta invención puede obtenerse usando síntesis química, procedimientos de clonación recombinante, PCR o cualquier combinación de los mismos. Los procedimientos de síntesis química de polinucleótidos son conocidos en la técnica y no necesitan describirse en detalle aquí. Un experto en la técnica

puede usar los datos de secuencia proporcionados en el presente documento para obtener un polinucleótido deseado empleando un sintetizador de ADN o haciendo un pedido a un servicio comercial.

Los polinucleótidos de esta invención pueden aislarse o replicarse usando PCR. La tecnología de PCR es el asunto objeto de las patentes U.S. Nos. 4.683.195; 4.800.159; 4.754.065; y 4.683.202 y se describe en PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis et al. eds., Birkhauser Press, Boston (1994)) o MacPherson et al. (1991) y (1995) supra, y referencias citadas allí. Alternativamente, un experto en la técnica puede usar las secuencias proporcionadas aquí y un sintetizador de ADN comercial para replicar el ADN. Por consiguiente, esta divulgación también proporciona un procedimiento para obtener los polinucleótidos de esta invención al proporcionar la secuencia lineal del polinucleótido, nucleótidos, moléculas cebadoras apropiadas, productos químicos tales como enzimas e instrucciones para su replicación y replicación o enlazamiento químico de los nucleótidos en la orientación adecuada para obtener los polinucleótidos. En una realización separada, estos polinucleótidos se aíslan adicionalmente. Aún adicionalmente, un experto en la técnica puede insertar el polinucleótido en un vector de replicación adecuado e insertar el vector en una célula huésped adecuada (procariota o eucariota) para replicación y amplificación. El ADN así amplificado puede aislarse de la célula mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Además, en el presente documento se proporciona un procedimiento para obtener polinucleótidos mediante este procedimiento, así como los polinucleótidos así obtenidos.

El ARN se puede obtener insertando primero un polinucleótido de ADN en una célula huésped adecuada. El ADN puede administrarse mediante cualquier procedimiento apropiado, por ejemplo, mediante el uso de un vehículo de suministro de genes apropiado (por ejemplo, liposoma, plásmido o vector) o mediante electroporación. Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe en ARN; el ARN puede aislarse luego usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se establece en Sambrook et al. (1989) supra. Por ejemplo, el ARNm se puede aislar usando diversas enzimas líticas o soluciones químicas de acuerdo con los procedimientos establecidos en Sambrook et al. (1989) supra, o extraído por resinas de unión a ácido nucleico siguiendo las instrucciones adjuntas proporcionadas por los fabricantes.

Los polinucleótidos que muestran complementariedad de secuencia u homología con un polinucleótido de esta invención son útiles como sondas de hibridación. Dado que se conoce la secuencia de codificación completa de la transcripción, cualquier porción de esta secuencia o secuencias homólogas se puede usar en los procedimientos divulgados en este documento.

En la técnica se sabe que no se necesita una sonda "perfectamente coincidente" para una hibridación específica. Los cambios menores en la secuencia de la sonda logrados por sustitución, delección o inserción de un pequeño número de bases no afectan la especificidad de hibridación. En general, se puede tolerar hasta un 20 % de falta de coincidencia de pares de bases (cuando está alineado de manera óptima). Preferiblemente, una sonda útil para detectar el ARNm mencionado anteriormente es al menos aproximadamente 80 % idéntica a la región homóloga. Más preferiblemente, la sonda es 85 % idéntica a la secuencia génica correspondiente después de la alineación de la región homóloga; incluso más preferiblemente, exhibe 90 % de identidad.

Estas sondas se pueden usar en radioensayos (por ejemplo, análisis de transferencia Southern y Northern) para detectar, pronosticar, diagnosticar o monitorizar diversas células o tejidos que contienen estas células. Las sondas también se pueden unir a un soporte sólido o a una matriz tal como un chip para usar en ensayos de cribado de alto rendimiento para la detección de la expresión del gen que corresponde a un polinucleótido divulgado en este documento. Por consiguiente, esta divulgación también proporciona una sonda que comprende o que corresponde a un polinucleótido divulgado en el presente documento, o su equivalente, o su complemento, o un fragmento del mismo, unido a un soporte sólido para su uso en cribados de alto rendimiento.

El tamaño total del fragmento, así como el tamaño de los tramos complementarios, dependerán del uso o aplicación prevista del segmento particular de ácido nucleico. Los fragmentos más pequeños generalmente encontrarán uso en realizaciones de hibridación, en las que la longitud de la región complementaria puede variar, tal como entre al menos 5 a 10 a aproximadamente 100 nucleótidos, o incluso la longitud completa de acuerdo con las secuencias complementarias que uno desea detectar.

Generalmente se prefieren las sondas de nucleótidos que tienen secuencias complementarias en tramos mayores de 5 a 10 nucleótidos de longitud, con el fin de aumentar la estabilidad y la selectividad del híbrido, y de ese modo mejorar la especificidad de las moléculas híbridadas particulares obtenidas. Más preferiblemente, se pueden diseñar polinucleótidos que tengan tramos complementarios de genes de 10 o más o más de 50 nucleótidos de longitud, o incluso más largos donde se desee. Tales fragmentos pueden prepararse fácilmente, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento por medios químicos, mediante la aplicación de tecnología de reproducción de ácido nucleico, tal como la tecnología de PCR con dos oligonucleótidos de cebado como se describe en la Patente U.S. No. 4.603.102 o mediante la introducción de secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para producción recombinante. En un aspecto, una sonda tiene aproximadamente 50-75 o más alternativamente, 50-100, nucleótidos de longitud.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden servir como cebadores para la detección de genes o transcritos de genes que se expresan en células descritas en el presente documento. En este contexto,

amplificación significa cualquier procedimiento que emplee una polimerasa dependiente de cebador capaz de replicar una secuencia diana con una fidelidad razonable. La amplificación puede llevarse a cabo mediante ADN-polimerasas naturales o recombinantes tales como la ADN polimerasa T7, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli* y la transcriptasa reversa. Solo con fines ilustrativos, un cebador tiene la misma longitud que el identificado para las sondas.

Un procedimiento para amplificar polinucleótidos es la PCR y los kits para la amplificación por PCR están disponibles comercialmente. Después de la amplificación, los fragmentos de ADN resultantes pueden detectarse mediante cualquier procedimiento apropiado conocido en la técnica, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de agarosa seguido de visualización con tinción con bromuro de etidio e iluminación ultravioleta.

Se han desarrollado procedimientos para administrar una cantidad efectiva de un vector o vehículo de suministro de genes a una célula y los expertos en la técnica los conocen y se describen en el presente documento. Los procedimientos para detectar la expresión génica en una célula son conocidos en la técnica e incluyen técnicas tales como hibridación con micromatrices de ADN, hibridación in situ, PCR, ensayos de protección de RNasa y análisis de transferencia Northern. Tales procedimientos son útiles para detectar y cuantificar la expresión del gen en una célula. Alternativamente, la expresión del polipéptido codificado puede detectarse por diversos procedimientos. En particular, es útil preparar anticuerpos policlonales o monoclonales que son específicamente reactivos con el polipéptido diana. Tales anticuerpos son útiles para visualizar células que expresan el polipéptido usando técnicas tales como inmunohistología, ELISA y transferencia Western. Estas técnicas se pueden usar para determinar el nivel de expresión del polinucleótido expresado.

Anticuerpos y derivados de los mismos

Esta invención también proporciona un anticuerpo que se une y/o reconoce y se une específicamente a un polipéptido aislado para su uso en los procedimientos de la invención. El anticuerpo puede ser cualquiera de los diversos anticuerpos descritos en el presente documento, ejemplos no limitantes de los mismos incluyen un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo revestido, un diacuerpo, un anticuerpo humanizado, un derivado de anticuerpo, un anticuerpo humanizado recombinante, o un derivado o fragmento de unión a antígeno del mismo. En un aspecto, el fragmento comprende, o alternativamente consiste esencialmente en, o aún además consiste en la CDR del anticuerpo. En un aspecto, el anticuerpo está marcado de forma detectable o comprende además un marcador detectable conjugado a él. También se proporciona una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de esta invención. Las composiciones que comprenden o que consisten alternativamente esencialmente en o aún además, que consisten en una o más de las realizaciones anteriores se proporcionan adicionalmente aquí. Además se proporcionan polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos y fragmentos, así como procedimientos para producir de manera recombinante los polipéptidos de anticuerpos y fragmentos de los mismos. Los polipéptidos de anticuerpos pueden producirse en una célula eucariota o procariota, o mediante otros procedimientos conocidos en la técnica y descritos en este documento.

Los anticuerpos pueden generarse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica y están bien descritas en la literatura. Existen varias metodologías para la producción de anticuerpos policlonales. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales se producen típicamente por inmunización de un mamífero adecuado tal como, pero sin limitación a, pollos, cabras, cobayas, hámsters, caballos, ratones, ratas y conejos. Se inyecta un antígeno en el mamífero, el cual induce a los linfocitos B a producir inmunoglobulinas específicas para el antígeno. Las inmunoglobulinas se pueden purificar a partir del suero del mamífero. Los anticuerpos específicos para IHF α e IHF β pueden generarse mediante la inyección de polipéptidos que corresponden a diferentes epítopos de IHF α e IHF β . Por ejemplo, los anticuerpos se pueden generar usando los 20 aminoácidos de cada subunidad tal como TFRPGQKLKSRVENASPKDE (SEQ ID NO. 34) para IHF α y KYVPHFKPGKELDRANIYG (SEQ ID No. 35) para IHF β , o alternativamente un anticuerpo que reconoce y se une específicamente a un polinucleótido o péptido que comprende una o más de las secuencias: TCTCAACGATTTA (SEQ ID NO. 341); WATCAANNNTTR (donde W es A o T, N es cualquier nucleótido y R es A o G; (SEQ ID NO. 342); MATITKLDIIEYLSDKYHLS (también denominado en este documento como hIFA1; (SEQ ID NO. 343); KYHLSKQDTKNVVENFLEEI (también denominado en este documento como hIFA2; (SEQ ID NO. 344); FLEEIRLSLESGQDVKLSGF (también denominado en el presente documento como hIFA3; (SEQ ID NO. 345); KLSGFNFELRDKSSRPGRN (también denominado en este documento como hIFA4; (SEQ ID NO. 346); RPGRNPKTGDVVPVSARRVV denominado en el presente documento como hIFA5; (SEQ ID NO. 347); ARRVTFKPGQKLRRARVEKTK (también denominado en este documento como hIFA6; (SEQ ID NO. 348), o un equivalente del mismo o un polinucleótido o péptido que tiene al menos 60 %, o alternativamente al menos 65 %, o alternativamente al menos 70 %, o alternativamente al menos 75 %, o alternativamente 80 %, o alternativamente al menos 85 %, o alternativamente al menos 90 %, o alternativamente al menos 95 % de identidad con el mismo o para secuencias de polipéptidos, que está codificada por un polinucleótido o su complemento que se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad con un polinucleótido que codifica tales secuencias de polipéptidos. Las condiciones de alta rigurosidad se describen anteriormente y se incorporan aquí como referencia. Los solicitantes han determinado que los aminoácidos en negrita y subrayados están muy conservados y, por lo tanto, en un aspecto, no se modifican ni alteran al designar un polipéptido equivalente. Ejemplos adicionales de polipéptidos equivalentes incluyen, por ejemplo, un polipéptido que consiste en o que comprende los polipéptidos mencionados anteriormente con la adición de hasta 25, o alternativamente 20, o

alternativamente 15, o alternativamente hasta 10, o alternativamente hasta 5 aminoácidos aleatorios en ya sea el terminal amino o carboxilo (o en ambos). Ejemplos adicionales incluyen anticuerpos que específicamente reconocen y se unen al polipéptido identificado en la Tabla 2 (e incorporado aquí como referencia). Las variaciones de esta metodología incluyen la modificación de adyuvantes, rutas y sitio de administración, volúmenes de inyección por sitio y el número de sitios por animal para una producción óptima y un tratamiento humano del animal. Por ejemplo, los adyuvantes se usan típicamente para mejorar o potenciar una respuesta inmune a los antígenos. La mayoría de los adyuvantes proporcionan un depósito de antígeno en el sitio de inyección, lo cual permite una liberación lenta del antígeno en los nodos linfáticos drenantes. Otros adyuvantes incluyen tensioactivos los cuales promueven la concentración de moléculas de antígeno proteico sobre un área de superficie grande y moléculas inmunoestimuladoras. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes para la generación de anticuerpos policlonales incluyen adyuvantes de Freund, sistema adyuvante Ribi y Titermax. Los anticuerpos policlonales pueden generarse usando procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en las patentes U.S. Nos. 7.279.559; 7.119.179; 7.060.800; 6.709.659; 6.656.746; 6.322.788; 5.686.073; y 5.670.153.

Los anticuerpos monoclonales pueden generarse usando técnicas de hibridoma convencionales conocidas en la técnica y bien descritas en la literatura. Por ejemplo, se produce un hibridoma fusionando una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como, pero sin limitación, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U397, MLA 144, ACT IV, MOLTA4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, CHO, PerC.6, YB2/O)) o similares, o heteromiomas, productos de fusión de los mismos, o cualquier célula o célula de fusión derivada de allí, o cualquier otra línea celular adecuada como se conoce en la técnica (véase, aquellos en las siguientes direcciones web, por ejemplo, atcc.org, lifetech.com., consultado por última vez el 26 de noviembre de 2007), con células productoras de anticuerpos, tales como, pero no limitado a, bazo aislado o clonado, sangre periférica, linfa, amígdalas u otras células inmunes o que contienen células B, o cualquier otra célula que exprese la cadena pesada o ligera constante o variable o marco o secuencias de CDR, ya sea como ácido nucleico endógeno o heterólogo, como recombinante o endógeno, viral, bacteriano, de algas, procariotas, anfibios, insectos, reptiles, peces, mamíferos, roedores, equinos, ovinos, caprinos, primates, eucariotas, ADN genómico, ADNc, ADNr, ADN o ARN mitocondrial, ADN o ARN de cloroplastos, ARNhn, ARNm, ARNt, cadena individual, doble o triple, hibridada y similares o cualquier combinación de los mismos. Las células productoras de anticuerpos también pueden obtenerse de la sangre periférica o, preferiblemente del bazo o los nodos linfáticos, de humanos u otros animales adecuados que han sido inmunizados con el antígeno de interés. También se puede usar cualquier otra célula huésped adecuada para expresar ácido nucleico heterólogo o endógeno que codifique un anticuerpo, fragmento especificado o variante del mismo, de la presente invención. Las células fusionadas (hibridomas) o las células recombinantes pueden aislarse usando condiciones de cultivo selectivas u otros procedimientos conocidos adecuados, y clonarse mediante dilución limitante o clasificación celular, u otros procedimientos conocidos.

Se pueden usar otros procedimientos adecuados para producir o aislar anticuerpos de la especificidad requerida, incluidos, pero no limitados a, procedimientos que seleccionan anticuerpos recombinantes de una biblioteca de péptidos o proteínas (por ejemplo, pero no limitado a, un bacteriófago, ribosoma, oligonucleótido, ARN, ADNc, o similares, muestran la biblioteca; por ejemplo, según esté disponible de diversos proveedores comerciales tales como MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.), Biolnvent (Lund, Suecia), Affitech (Oslo, Noruega) utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Los procedimientos conocidos en la técnica se describen en la bibliografía de patentes, algunos de los cuales incluyen las patentes U.S. Nos. 4.704.692; 5.723.323; 5.763.192; 5.814.476; 5.817.483; 5.824.514; 5.976.862. Los procedimientos alternativos dependen de la inmunización de animales transgénicos. (por ejemplo, ratones SCID, Nguyen et al. (1977) *Microbiol. Immunol.* 41:901-907 (1997); Sandhu et al. (1996) *Crit. Rev. Biotechnol.* 16:95-118; Eren et al. (1998) *Immunol.* 93:154-161 que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como se conoce en la técnica y/ o como se describe en este documento. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, visualización de ribosomas (Hanes et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4937-4942; Hanes et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14130-14135); tecnologías de producción de anticuerpos de células individuales (por ejemplo, procedimiento de anticuerpos de linfocitos seleccionados ("SLAM") (U.S. Patent No. 5,627,052, Wen et al. (1987) *J. Immunol.* 17:887-892; Babcook et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848); microgotas de gel y citometría de flujo (Powell et al. (1990) *Biotechnol.* 8:333-337; One Cell Systems, (Cambridge, Mass.); Gray et al. (1995) *J. Imm. Meth.* 182:155-163; y Kenny et al. (1995) *Bio. Technol.* 13:787-790); selección de células B (Steenbakkers et al. (1994) *Molec. Biol. Reports* 19:125-134).

Los derivados de anticuerpos de la presente invención también se pueden preparar suministrando un polinucleótido que codifica un anticuerpo de esta invención a un huésped adecuado tal como para proporcionar animales o mamíferos transgénicos, tales como cabras, vacas, caballos, ovejas y similares, que producen tales anticuerpos en su leche. Estos procedimientos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes U.S. Nos. 5.827.690; 5.849.992; 4.873.316; 5.849.992; 5.994.616; 5.565.362; y 5.304.489.

El término "derivado de anticuerpo" incluye modificación postraducciona a la secuencia polipeptídica lineal del anticuerpo o fragmento. Por ejemplo, la Patente U.S. No. 6.602.684 B1 describe un procedimiento para la generación de formas de anticuerpos modificadas con glicol, que incluyen moléculas de anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos o proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, que tiene mayor toxicidad celular mediada por Fc y las glucoproteínas generadas de esta manera.

Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden incluir derivados que se modifican por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de tal manera que la unión covalente no impide que el anticuerpo genere una respuesta antiidiotípica. Los derivados de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que han sido modificados por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Además, los derivados pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los derivados de anticuerpos también se pueden preparar suministrando un polinucleótido de esta invención para proporcionar plantas transgénicas y células de plantas cultivadas (por ejemplo, pero sin limitarse a tabaco, maíz y lenteja de agua) que producen tales anticuerpos, porciones específicas o variantes en las partes de la planta o en células cultivadas a partir de las mismas. Por ejemplo, Cramer et al. (1999) *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 240: 95-118 y las referencias allí citadas, describen la producción de hojas de tabaco transgénicas que expresan grandes cantidades de proteínas recombinantes, por ejemplo, usando un promotor inducible. El maíz transgénico se ha utilizado para expresar proteínas de mamíferos a niveles de producción comercial, con actividades biológicas equivalentes a las producidas en otros sistemas recombinantes o purificadas de fuentes naturales. Véase, por ejemplo, Hood et al. (1999) *Adv. Exp. Med. Biol.* 464: 127-147 y referencias citadas allí. Los derivados de anticuerpos también se han producido en grandes cantidades a partir de semillas de plantas transgénicas, incluidos fragmentos de anticuerpos, tales como anticuerpos de cadena sencilla (scFv's), incluidas semillas de tabaco y tubérculos de patata. Véase, por ejemplo, Conrad et al. (1998) *Plant Mol. Biol.* 38: 101-109 y referencias citadas allí. Por lo tanto, los anticuerpos también se pueden producir usando plantas transgénicas, de acuerdo con procedimientos conocidos.

Los derivados de anticuerpos también se pueden producir, por ejemplo, mediante la adición de secuencias exógenas para modificar la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, afinidad, tasa inactiva, tasa activa, avidéz, especificidad, semivida o cualquier otra característica adecuada. Generalmente, parte o la totalidad de las secuencias de CDR no humanas o humanas se mantienen mientras que las secuencias no humanas de las regiones variables y constantes se reemplazan con aminoácidos humanos u otros aminoácidos.

En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente involucrados en influir en la unión al antígeno. La humanización o la ingeniería de los anticuerpos se puede realizar utilizando cualquier procedimiento conocido, tal como, pero no limitado a, los descritos en las patentes U.S. Nos. 5.723.323; 5.976.862; 5.824.514; 5.817.483; 5.814.476; 5.763.192; 5.723.323; 5.766.886; 5.714.352; 6.204.023; 6.180.370; 5.693.762; 5.530.101; 5.585.089; 5.225.539; y 4.816.567.

Los anticuerpos quiméricos, humanizados o primatizados de la presente invención pueden prepararse en base a la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado usando técnicas estándar de biología molecular. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse del hibridoma murino de interés y manipularse para contener secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) utilizando técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas se pueden unir a regiones constantes humanas usando procedimientos conocidos en la técnica (Patente U.S. No. 4.816.567). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas pueden insertarse en un marco humano usando procedimientos conocidos en la técnica (Patente U.S. No. 5.225.539 y Patentes U.S. No. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370). De manera similar, para crear un anticuerpo primatizado, las regiones CDR murinas pueden insertarse en un marco de primates usando procedimientos conocidos en la técnica (WO 93/02108 y WO 99/55369).

Los anticuerpos divulgados en este documento también pueden modificarse para crear anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos quiméricos son aquellos en los que el ADN codifica los diversos dominios de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de más de una especie. Véase, por ejemplo, la Patente U.S. No. 4.816.567.

Alternativamente, los anticuerpos de esta invención también pueden modificarse para crear anticuerpos revestidos. Los anticuerpos revestidos son aquellos en los que los residuos de aminoácidos exteriores del anticuerpo de una especie son reemplazados juiciosamente o "revestidos" con los de una segunda especie para que los anticuerpos de la primera especie no sean inmunogénicos en la segunda especie, reduciendo así la inmunogenicidad del anticuerpo. Dado que la antigenicidad de una proteína depende principalmente de la naturaleza de su superficie, la inmunogenicidad de un anticuerpo podría reducirse reemplazando los residuos expuestos que difieren de los que se encuentran usualmente en los anticuerpos de otras especies de mamíferos. Este reemplazo juicioso de los residuos exteriores debería tener poco o ningún efecto en los dominios interiores o en los contactos entre dominios. Por lo tanto, las propiedades de unión al ligando no deberían verse afectadas como consecuencia de las alteraciones las cuales se limitan a los residuos del marco de la región variable. El procedimiento se conoce como "revestido" ya que solo se altera la superficie externa o la piel del anticuerpo, los residuos de soporte permanecen intactos.

El procedimiento de "revestido" hace uso de los datos de secuencia disponibles para dominios variables de anticuerpos humanos compilados por Kabat et al. (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th ed., Bethesda, Md., National Institutes of Health, actualizaciones de esta base de datos y otras bases de datos estadounidenses y extranjeras accesibles (tanto ácidos nucleicos como proteínas). Ejemplos no limitativos de los

procedimientos usados para generar anticuerpos revestidos incluyen EP 519596; Patente U.S. No. 6.797.492; y descrito en Padlan et al. (1991) Mol. Immunol 28 (4-5): 489-498.

5 El término "derivado de anticuerpo" también incluye "diacuerpos" los cuales son pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, en los que los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos. (Véase, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448.) Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. (Véase también, la Patente U.S. No. 6.632.926 de Chen et al. la cual divulga variantes de anticuerpos que tienen uno o más aminoácidos insertados en una región hipervariable del anticuerpo progenitor y una afinidad de unión por un antígeno objetivo diana el cual es al menos aproximadamente dos veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo progenitor por el antígeno).

10 El término "derivado de anticuerpo" incluye además moléculas de anticuerpo modificadas por ingeniería genética, fragmentos y dominios únicos tales como scFv, dAbs, nanocuerpos, minicuerpos, Unicuerpos y Afficuerpos (Holliger & Hudson (2005) Nature Biotech 23 (9): 1126-36; Publicación de patente No. US 2006/0211088; Publicación PCT No. WO2007/059782; Patente US No. 5,831,012).

15 El término "derivado de anticuerpo" incluye además "anticuerpos lineales". El procedimiento para fabricar anticuerpos lineales se conoce en la técnica y se describe en Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8 (10): 1057-1062. En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem ($V_H - C_H 1 - V_H - C_H 1$) los cuales forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

20 Los anticuerpos de esta invención pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes mediante procedimientos conocidos que incluyen, pero no se limitan a, purificación de proteína A, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción de ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. La cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") también se puede utilizar para la purificación.

25 Los anticuerpos de la presente invención incluyen productos purificados naturalmente, productos de procedimientos químicos sintéticos y productos producidos por técnicas recombinantes de un huésped eucariota, que incluyen, por ejemplo, levadura, células superiores de plantas, insectos y mamíferos, o alternativamente de un huésped procarionta como se describe más arriba. Se describen varios sistemas de producción de anticuerpos en Birch & Radner (2006) Adv. Drug Delivery Rev. 58: 671-685.

30 El término "anticuerpo" también pretende incluir anticuerpos de todos los isotipos y subclases de inmunoglobulina. Los isotipos particulares de un anticuerpo monoclonal pueden prepararse bien sea directamente seleccionando a partir de una fusión inicial, o prepararse de forma secundaria, a partir de un hibridoma progenitor que secreta un anticuerpo monoclonal de isotipo diferente usando la técnica de selección sib para aislar variantes de conmutación de clase usando el procedimiento descrito en Steplewski et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8653 o Spira et al. (1984) J. Immunol. Procedimientos 74: 307. Alternativamente, se pueden usar técnicas de ADN recombinante.

35 El aislamiento de otros anticuerpos monoclonales con la especificidad de los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento también puede ser realizado por un experto en la técnica mediante la producción de anticuerpos antiidiotípicos. Herlyn et al. (1986) Science 232: 100. Un anticuerpo antiidiotípico es un anticuerpo el cual reconoce determinantes únicos presentes en el anticuerpo monoclonal de interés.

40 En algunos aspectos de esta invención, será útil marcar de manera detectable o terapéutica el anticuerpo. Los marcadores adecuados se describen supra. Los procedimientos para conjugar anticuerpos con estos agentes son conocidos en la técnica. Solo con fines ilustrativos, los anticuerpos pueden marcarse con una fracción detectable tal como un átomo radiactivo, un cromóforo, un fluoróforo o similares. Tales anticuerpos marcados pueden usarse para técnicas de diagnóstico, bien sea *in vivo* o en una muestra de prueba aislada.

45 El acoplamiento de anticuerpos a haptenos de bajo peso molecular puede aumentar la sensibilidad del anticuerpo en un ensayo. Los haptenos se pueden detectar específicamente por medio de una segunda reacción. Por ejemplo, es común usar haptenos tales como biotina, los cuales reaccionan con avidina, o dinitrofenol, piridoxal y fluoresceína, los cuales pueden reaccionar con anticuerpos anti-hapteno específicos. Véase, Harlow and Lane (1988) supra.

50 La región variable de los anticuerpos de la presente invención puede modificarse mutando residuos de aminoácidos dentro de las regiones VH y/o VL CDR 1, CDR 2 y/o CDR 3 para mejorar una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo. Las mutaciones pueden introducirse mediante mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR y el efecto sobre la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, puede evaluarse en ensayos apropiados *in vitro* o *in vivo*. Preferiblemente se introducen modificaciones conservadoras y típicamente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR. Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos.

Se pueden realizar modificaciones en el marco de los anticuerpos para disminuir la inmunogenicidad, por ejemplo, mediante "mutación inversa" de uno o más residuos del marco a la secuencia de la línea germinal correspondiente.

Además, los anticuerpos de la invención pueden diseñarse para incluir modificaciones dentro de la región Fc para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como semivida en suero, fijación del complemento, unión al receptor Fc y/o citotoxicidad celular dependientes de antígeno. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, alteraciones del número de residuos de cisteína en la región bisagra para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo (Patente U.S. No. 5.677.425); y mutaciones de aminoácidos en la región bisagra Fc para disminuir la semivida biológica del anticuerpo (Patente U.S. No. 6.165.745).

Adicionalmente, los anticuerpos de la invención pueden modificarse químicamente. La glicosilación de un anticuerpo puede alterarse, por ejemplo, modificando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo para aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno (patentes U.S. Nos. 5.714.350 y 6.350.861). Alternativamente, para aumentar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, se puede obtener un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras GlcNac bisectantes aumentadas mediante la expresión del anticuerpo en una célula huésped con un mecanismo de glicosilación alterado (Shields et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17: 176-180).

Los anticuerpos de la invención pueden pegarse para aumentar la semivida biológica haciendo reaccionar el anticuerpo o fragmento del mismo con polietilenglicol (PEG) o un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG, bajo condiciones en las que uno o más grupos de PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La pegilación de anticuerpos puede llevarse a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se usa en el presente documento, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivar otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxi- o ariloxipolietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. El anticuerpo que se va a pegar puede ser un anticuerpo aglicosilado. Los procedimientos para pegar proteínas son conocidos en la técnica y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención (EP 0 154 316 y EP 0 401 384).

Adicionalmente, los anticuerpos pueden modificarse químicamente conjugando o fusionando la región de unión al antígeno del anticuerpo a la proteína sérica, tal como la albúmina sérica humana, para aumentar la semivida de la molécula resultante. Tal enfoque se describe, por ejemplo, en los documentos EP 0322094 y EP 0 486 525.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención pueden conjugarse con un agente de diagnóstico y usarse de forma diagnóstica, por ejemplo, para monitorizar el desarrollo o la progresión de una enfermedad y determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. Ejemplos de agentes de diagnóstico incluyen enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones que utilizan diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente al anticuerpo o fragmento del mismo, o indirectamente, a través de un conector usando técnicas conocidas en la técnica. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa. Ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina. Ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina. Un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol. Ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina. Ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, Indio-111, Lutecio-171, Bismuto-212, Bismuto-213, Astatina-211, Cobre-62, Cobre-64, Cobre-67, Yttrio-90, Yodo-125, Yodo-131, Fósforo-32, Fósforo-33, Escandio-47, Plata-111, Galio-67, Praseodimio-142, Samario-153, Terbio-161, Disprobio-166, Holmio-166, Renio-186, Renio-188, Renio-189, Plomo-212, Radio-223, Actinio-225, Hierro-59, Selenio-75, arsénico-77, Estroncio-89, Molibdeno-99, Rodio-105, Paladio-109, Praseodimio-143, Prometio-149, Erbio-169, Iridio-194, Oro-198, Oro-199 y Plomo-211. Los anticuerpos monoclonales se pueden conjugar indirectamente con iones radiometales mediante el uso de agentes quelantes bifuncionales que están unidos covalentemente a los anticuerpos. Los agentes quelantes pueden unirse a través de aminas (Meares et al. (1984) Anal. Biochem. 142: 68-78); grupos sulfhidrales (Koyama (1994) Chem. Abstr. 120: 217262t) de residuos de aminoácidos y grupos de carbohidratos (Rodwell et al. (1986) PNAS USA 83: 2632-2636; Quadri et al. (1993) Nucl. Med. Biol 20: 559-570).

Además, los anticuerpos o fragmentos pueden conjugarse con un agente terapéutico, por ejemplo, un antimicrobiano que tratará o evitará la recurrencia de una infección por *Burkholderia*. Los agentes terapéuticos adecuados incluyen ceftazidima, ciprofloxacina, imipenem y minociclina.

Moléculas conjugadas adecuadas adicionales incluyen ribonucleasa (RNasa), DNasa I, un ácido nucleico antisentido, una molécula de ARN inhibitoria tal como una molécula de ARNip, un ácido nucleico inmunoestimulador, aptámeros, ribozimas, moléculas formadoras de tríplex y secuencias de guía externas. Los aptámeros son ácidos nucleicos pequeños que varían de 15 a 50 bases de longitud que se pliegan en estructuras secundarias y terciarias definidas, tales como los bucles del tallo o los cuartetos G, y pueden unirse a moléculas pequeñas, tales como ATP

(patente U.S: No. 5.631.146) y teofilina. (Patente U.S. No. 5.580.737), así como moléculas grandes, tales como transcriptasa reversa (Patente U.S. No. 5.786.462) y trombina (Patente U.S. No. 5.543.293). Las ribozimas son moléculas de ácido nucleico que son capaces de catalizar una reacción química, ya sea intramolecularmente o intermolecularmente. Las ribozimas típicamente escinden los sustratos de ácido nucleico a través del reconocimiento y la unión del sustrato objetivo con la escisión subsecuente. Las moléculas de ácido nucleico con función de formación triple pueden interactuar con el ácido nucleico bicatenario o monocatenario formando un tríplex, en el que tres cadenas de ADN forman un complejo dependiente del emparejamiento de bases de Watson-Crick y Hoogsteen. Las moléculas triplex pueden unirse a regiones objetivo con alta afinidad y especificidad.

Las moléculas de ácido nucleico funcionales pueden actuar como efectoras, inhibidoras, moduladoras y estimuladoras de una actividad específica poseída por una molécula diana, o las moléculas de ácido nucleico funcional pueden poseer una actividad de novo independiente de cualquier otra molécula.

Los agentes terapéuticos se pueden enlazar al anticuerpo directa o indirectamente, utilizando cualquiera de los numerosos procedimientos disponibles. Por ejemplo, se puede unir un agente en la región bisagra del componente de anticuerpo reducido mediante la formación de enlaces disulfuro, usando entrecruzadores tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinilo (SPDP), o mediante una fracción de carbohidrato en el Región Fc del anticuerpo (Yu et al. (1994) *Int. J. Cancer* 56: 244; Upeslakis et al. "Modification of Antibodies by Chemical Methods," *Monoclonal antibodies: principles and applications*, Birch et al. (eds.), pp. 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in *Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application*, Ritter et al. (eds.), pp. 60-84 (Cambridge University Press 1995)).

Las técnicas para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos son bien conocidas (Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates" 1982 *Immunol. Rev.* 62:119-58).

Los anticuerpos de la invención o las regiones de unión a antígeno de los mismos pueden enlazarse a otra molécula funcional tal como otro anticuerpo o ligando para que un receptor genere una molécula biespecífica o multiespecífica que se una a al menos dos o más sitios de unión diferentes o moléculas diana. El enlazamiento del anticuerpo a una o más moléculas de unión, tal como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, se puede hacer, por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética o asociación no covalente. Las moléculas multiespecíficas pueden incluir además una tercera especificidad de unión, además del primer y segundo epítipo objetivo.

Las moléculas bi-específicas y multi-específicas pueden prepararse usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada unidad de unión de la molécula biespecífica se puede generar por separado y luego conjugarse entre sí. Cuando las moléculas de unión son proteínas o péptidos, se puede usar una variedad de agentes de acoplamiento o entrecruzamiento para la conjugación covalente. Ejemplos de agentes de entrecruzamiento incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-l-carboxilato (sulfo-SMCC) (Karpovsky et al., 1984 *J. Exp. Med.* 160: 1686; Liu et al., 1985 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8648). Cuando las moléculas de unión son anticuerpos, se pueden conjugar mediante enlaces sulfhidrilo de las regiones de bisagra C-terminal de las dos cadenas pesadas.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención pueden estar enlazados a una fracción que es tóxica para una célula a la cual se une el anticuerpo para formar anticuerpos "agotadores". Estos anticuerpos son particularmente útiles en aplicaciones donde se desea agotar una célula NK.

Los anticuerpos de la invención también pueden unirse a soportes sólidos, los cuales son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Los anticuerpos también pueden unirse a muchos portadores diferentes, por ejemplo, portadores farmacéuticamente aceptables. Por lo tanto, esta invención también proporciona composiciones que contienen los anticuerpos y otra sustancia, activa o inerte. Ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasa, celulosa natural y modificada, poliacrilamida, agarosa y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Los expertos en la técnica conocerán otros portadores adecuados para anticuerpos, o podrán determinarlos, utilizando experimentación de rutina.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar, la invención.

El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

Procedimientos experimentales

Experimento no. 1

Materiales y procedimientos

5 **Declaración de Ética.** Antes de la recolección de esputos de pacientes pediátricos en el Nationwide Children's Hospital, se obtuvo el consentimiento informado por escrito y la autorización de los padres o un representante legalmente autorizado. Este procedimiento estuvo en concordancia con todas las pautas institucionales y federales y se realizó de acuerdo con un protocolo aprobado por la Institutional Review Board at Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio.

10 **Formación de biopelículas *in vitro*.** Las cepas de *B. cenocepacia* (incluidas las cepas K56-2, DFA2 y JRL2) se inocularon de una reserva congelada en caldo LB (BBL) y se cultivaron durante la noche a 37 °C con agitación a 200 rpm. Luego, los cultivos se diluyeron 1: 00 en caldo fresco, la densidad óptica se leyó a 600 nm y se ajustó a una concentración final de 106 CFU de medio ml *B. cenocepacia*. Las bacterias se diluyeron adicionalmente 1:2500 en caldo LB y se añadieron 200 µl de la suspensión bacteriana a cada pocillo de un cubreobjetos con cámara de 8 pocillos LabTek II (LabTek). Los portaobjetos se incubaron estáticos durante 16 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada, momento en el que se aspiró el medio y se reemplazó con caldo LB fresco. Después de 8 horas adicionales (24 horas de tiempo total de incubación), las biopelículas se tiñeron o se trataron con antisuero o antibiótico. Los ensayos se realizaron un mínimo de tres veces.

20 **Distribución de IHF y ADN dentro de una biopelícula de *B. cenocepacia*.** Para examinar la distribución relativa de IHF dentro de las biopelículas formadas por cepas de *B. cenocepacia*, se incubaron biopelículas de 24 horas no fijadas con suero de conejo ingenuo o IHF anti-*E. coli* de conejo (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4: 625-637) y revelado con IgG anti-conejo de cabra conjugada con AlexaFluor 594 (Invitrogen). El ADN dentro de las biopelículas se tiñó con anticuerpo anti-ADNbc (Abcam, Inc.) y se reveló con IgG anti-ratón de cabra conjugada con AlexaFluor 647 (Molecular Probes). Las células bacterianas intactas se tiñeron con la tinción de membrana FilmTracer™ FM® 1-43 Green Biofilm Stain (Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las imágenes se recolectaron con un microscopio confocal de escaneo meta-láser Zeiss 510 (Carl Zeiss) usando un objetivo 63X. Las imágenes tridimensionales se reconstruyeron con AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss).

25 Para determinar la abundancia relativa de ADN en una biopelícula de 24 horas formada por *B. cenocepacia*, se determinó la relación de ADN a bacteria usando el software de adquisición de imágenes Zeiss en el que se comparó la intensidad fluorescente relativa del marcado de anti-ADNbc con FilmTracer™. También se establecieron biopelículas formadas por *Haemophilus influenzae* no tipificable (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4: 625-637; Jurcisek et al. (2011) J. Vis. Exp.) y se tiñeron de manera similar.

30 **Distribución de IHF dentro de esputo humano.** Para visualizar el marcado de IHF con esputo humano, se recolectaron muestras de esputo de 3 pacientes pediátricos con CF que también eran cultivos positivos para *B. cenocepacia* bajo un protocolo IRB aprobado. Los esputos se embebieron en el compuesto OCT (Fisher Scientific) y se congelaron rápidamente en la fase de vapor de nitrógeno líquido. Se cortaron secciones en serie de diez micrones y se adhirieron a portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos se secaron al aire, se fijaron en acetona fría, se equilibraron en un tampón que contenía Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M y Tween 20 al 0,05 % (pH 7,4) y luego se bloquearon con potenciador de señal image-iT FX (sondas moleculares) y Background Sniper (BioCare Medical).

35 Las secciones se incubaron con anti-IHF policlonal o suero de conejo ingenuo, y se revelaron con IgG-Alexafluor 594 anti-conejo de cabra (Invitrogen). El ADN se contratiñó con reactivo antidesvanecimiento Prolong Gold con DAPI (Molecular Probes). Las imágenes se vieron como se describió anteriormente.

40 **Resolución de biopelículas de *B. cenocepacia* establecidas.** Para evaluar la capacidad del antisuero para resolver una biopelícula formada *in vitro*, primero se establecieron biopelículas de 24 horas utilizando la cepa K56-2 como se describe, y luego se expusieron bien sea a suero de conejo ingenuo o IHF anti-*E. coli* de conejo diluido 1:50 en caldo LB, o solo caldo LB, durante 16 horas. Las biopelículas se tiñeron luego con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD® BacLight™ para microscopía (Molecular Probes) como se describió anteriormente (Jurcisek et al. (2011) J. Vis. Exp.), Luego se fijaron con una solución de 16 % de paraformaldehído – 2,5 % de glutaraldehído: 4 % de ácido acético en tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4, antes de la obtención de imágenes inmediatas por microscopía confocal como se describió anteriormente. La cuantificación del espesor promedio y la biomasa media se determinó mediante análisis COMSTAT2 (Heydorn et al. (2000) Microbiology 146 (Pt 10): 2409-2415). Como medida adicional para confirmar que la aplicación de suero de conejo ingenuo e inmune no indujo la muerte celular, se recolectaron *B. cenocepacia* tanto planctónica como adherente a biopelículas 16 horas después del tratamiento, se tiñeron las células no fijadas con Kit de viabilidad bacteriana y recuento LIVE/DEAD® BacLight™ para citometría de flujo (Molecular Probes) y se distinguieron entre bacterias vivas y muertas utilizando un citómetro de flujo calibrado C6 (Accuri). Los ensayos se realizaron un mínimo de tres veces.

55 **Enriquecimiento de IgG a partir de suero entero.** Para confirmar que la resolución de la biopelícula estuvo mediada por anticuerpos y no por otros componentes del suero, se purificó IgG a partir de suero anti-IHF de conejo

con columnas HiTrap Protein G HP (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se recolectó tanto el eluyente que pasó a través de la columna después de la aplicación de suero como la fracción enriquecida con IgG. Para demostrar que anti-IHF y anti-IHF enriquecido con IgG reconocieron IHF purificado además de IHF nativo expresado por la cepa K56-2 de *B. cenocepacia*, fueron realizados SDS-PAGE y transferencia Western. En resumen, 0.5 µg de IHF purificado ([25]; el regalo de Howard Nash, NIH) y 5 µg de lisado de células enteras *B. cenocepacia* se separaron en un gel TGX Mini-PROTEAN 4-15 % (BioRad) en tampón de Tris/Glicina/SDS (BioRad) luego transferido a membranas de nitrocelulosa (Invitrogen). Las membranas se bloquearon durante la noche a 4 °C en leche desnatada al 3 % en solución salina tamponada con Tris con Tween20 al 0,5 % (Fisher Scientific) antes de la incubación con anti-IHF de conejo o anti-IHF enriquecido con IgG seguido de IgG-HRP anti-conejo de cabra (Invitrogen). Las transferencias se desarrollaron con el kit de sustrato CN/DAB (Pierce) y las imágenes se capturaron con el densitómetro BioRad GS800.

Efecto sinérgico de anti-IHF y antibióticos en la resolución de biopelículas. El examen del efecto sinérgico de los antibióticos combinados con el antisuero dirigido contra IHF cuando se aplica a una biopelícula formada por la cepa K56-2 de *B. cenocepacia* requirió la determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC) de varios antibióticos para cultivos planctónicos de la cepa K56-2 de *B. cenocepacia*. Para hacerlo, se inocularon 100 CFU de *B. cenocepacia* en caldo LB que contenía diluciones en serie de dos veces de los siguientes antibióticos: ceftazidima, ciprofloxacina, imipenem, meropenem, minociclina, sulfametoxazol-trimetoprima o tobramicina (Sigma). Los cultivos se incubaron estáticos durante 24 horas y se evaluó la turbidez del cultivo. La CIM para *B. cenocepacia* planctónica se identificó como la concentración de antibiótico a la que no se observó crecimiento bacteriano. Con esta información, las biopelículas de *B. cenocepacia* establecidas se trataron con una dilución 1:50 de anti-IHF, antibiótico en el MIC determinado, anti-IHF más antibiótico o medio solo durante 16 horas antes de la tinción de viabilidad con Kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD® BacLight™ y visualización por microscopía confocal como se describió anteriormente. Se utilizaron las siguientes concentraciones de antibióticos: ceftazidima- 16 µg/ml, ciprofloxacina- 2 µg/ml, imipenem- 32 µg/ml, meropenem- 16 µg/ml, minociclina- 4 µg/ml, sulfametoxazol-trimetoprima- 16 µg/ml y tobramicina: 512 µg/ml. La cuantificación del espesor promedio y la biomasa media se determinó mediante análisis COMSTAT2. Los ensayos se realizaron un mínimo de tres veces.

Tratamiento de biopelículas establecidas con Pulmozyme®. Para examinar el resultado del tratamiento de las biopelículas establecidas de la cepa K56-2 de *B. cenocepacia* con Pulmozyme® (dornase alfa; Genentech, Inc.), las biopelículas establecidas se trataron con una dilución 1:50 de anti-IHF, 0,25 mg de Pulmozyme®, anti-IHF más Pulmozyme® o medio solo durante 16 horas antes de la tinción de viabilidad y visualización por microscopía confocal. La cuantificación del espesor promedio y la biomasa media se determinó mediante análisis COMSTAT2. Los ensayos se realizaron un mínimo de tres veces.

Impacto del anticuerpo anti-IHF en la supervivencia de *B. cenocepacia* dentro de macrófagos. La cepa MHK1 de *B. cenocepacia* (Hamad et al. (2010) Appl. Environ. Microbiol. 76: 3170-3176) que tiene una mutación en una bomba antibiótica de eflujo que confiere sensibilidad a la gentamicina pero no altera el tráfico del mutante en los macrófagos se usó para este ensayo. La cepa MHK1 se cultivó como se describió anteriormente y luego se trató con suero inalterado o suero anti-IHF a una concentración de 1:1000 durante 15 minutos. Luego se añadió *B. cenocepacia* tratada a macrófagos murinos derivados de médula ósea durante 1 hora. Para matar las bacterias extracelulares, se añadieron medios de Iscove (GIBCO) que contenían FBS inactivado por calor al 10 % (GIBCO) y 50 µg de gentamicina/ml (GIBCO) durante 30 minutos. Los macrófagos se sometieron a lisis a las 2, 4 y 6 horas después de la infección y los lisados se sembraron en placas para determinar CFU *B. cenocepacia*/ml. Los ensayos se realizaron un mínimo de tres veces.

Experimentos de huella de DNasa. La reacción de PCR amplificó los 386 pb de ADN corriente arriba de BCAL0339 y BCAL0340. El amplicón marcado isotópicamente en el extremo (32P) se usó en una reacción de unión con IHF de *E. coli* cristalográficamente puro (Rice et al. (1996) Cell 87: 1295-1306; el obsequio de Howard Nash, NIH) y subsecuentemente en ensayos de huella de DNasa I (Hung et al. (2011) J. Bacteriol. 193: 3642-3652).

Procedimientos de estadística. Para determinar diferencias significativas en el espesor promedio de la biopelícula y la biomasa, y en los ensayos de asociación de macrófagos, se realizaron dos pruebas T emparejadas de muestra utilizando el software GraphPad Prism, versión 6.00.

Resultados

Evidencia por la presencia de ADN extracelular (ADNe) abundante en biopelículas formadas por *B. cenocepacia* in vitro. Para caracterizar primero la estructura básica de las biopelículas de *B. cenocepacia* cuando se formaron *in vitro*, se cultivó estáticamente la cepa K56-2 de *B. cenocepacia* en un portaobjetos de cámara durante 24 horas antes de marcar con FilmTracer FM 1-43. Como se muestra en la **FIG. 1A**, *B. cenocepacia* formó una biopelícula robusta de aproximadamente 26 µm de altura con torres características. Para determinar ahora si *B. cenocepacia* incorporó ADN en su matriz de biopelícula, la biopelícula no fijada se marcó con un anticuerpo monoclonal para detectar la presencia de ADNbc (blanco). La biopelícula formada contenía una cantidad abundante de ADNe que era particularmente denso en la base de la biopelícula (**Figura 1B**), lo que sugiere que este componente de la matriz podría estar desempeñando un papel esencial en la adherencia y anclaje bacteriano durante las primeras etapas del desarrollo de la biopelícula. De manera interesante, aunque visualmente aparente,

se confirmó un análisis COMSTAT adicional tanto de una biopelícula de *B. cenocepacia* como de una formada por *Haemophilus influenzae* no tipificable (NTHI) (datos no mostrados) luego marcados de manera idéntica y utilizando canales láser separados (para detectar bacterias y ADN) confirmó de manera más objetiva que *B. cenocepacia* incorporó aproximadamente un 30 % más de ADNe por célula bacteriana en su biopelícula que este importante patógeno humano adicional de vía aérea (Jurcisek et al. (2007) J. Bacteriol. 189: 3868-3875).

Demostración de una proteína DNABII dentro de biopelículas generadas por *B. cenocepacia*. Para determinar si las biopelículas formadas por la cepa K56-2 de *B. cenocepacia* contenían un miembro de la familia de proteínas DNABII, se incubó una biopelícula *in vitro* por la cepa K56-2 de *B. cenocepacia* con anticuerpo anti-IHF de conejo [antisuero contra *E. coli* IHF que reacciona de forma cruzada con múltiples miembros de la familia DNABII (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4: 625-637)] y se observó marcado en toda la biopelícula (**Figura 1C**).

Para evaluar ahora si las observaciones realizadas *in vitro* fueron relevantes para el estado clínico de los pacientes con CF, así como para determinar si, como se ve con NTHI [20], IHF se colocó en los vértices de las cadenas cruzadas de ADNe presentes dentro de la biopelícula formada por *B. cenocepacia*, se obtuvieron muestras de esputo de pacientes con CF que se sabe que están infectados con *B. cenocepacia*. Las muestras se congelaron rápidamente y se inmunomarcaron usando el mismo anticuerpo anti-IHF. Los inventores observaron un marcado pesado de 3/3 (100 %) de las muestras de esputo recuperadas hasta la fecha. De manera notable, se observó un marcado específico de virtualmente el 100 % de los vértices formados por la superposición de cadenas de ADNbc presentes dentro de estas muestras (**Figura 2**). Dada la gran cantidad de ADNe presente dentro de la matriz EPS de una biopelícula producida por *B. cenocepacia*, y el hecho de que el IHF parecía estar posicionado críticamente dentro de esta matriz, era que el objetivo de esta proteína para la intervención podría dar como resultado el colapso estructural de la biopelícula. Si ocurriera este colapso, se razonó además que esto podría facilitar en gran medida el acceso de efectores inmunes, antibióticos u otros agentes terapéuticos a las bacterias anteriormente protegidas por el EPS, promoviendo así su erradicación.

Demostración de la capacidad del anti-IHF para perturbar una biopelícula formada por *B. cenocepacia in vitro*. Para probar una de estas hipótesis, las biopelículas de cepa K56-2 de *B. cenocepacia* de 24 horas se trataron bien sea con medio (**Figura 3A**), suero de conejo ingenuo (diluido 1:50) (**Figura 3B**) o suero anti-IHF de conejo (a una dilución arbitrariamente seleccionada de 1:50) (**Figura 3C**). Después de 24 horas de incubación, estas biopelículas fueron analizadas a través del software COMSTAT y encontraron que el tratamiento con suero de conejo ingenuo indujo un cambio pequeño y estadísticamente no significativo en el grosor de la biopelícula, pero no tuvo ningún efecto sobre la biomasa media sobre la observada cuando se usó medio estéril (**Figuras 3G y 3H**). Este efecto se atribuye a los anticuerpos no específicos dentro del suero de conejo completo que reaccionan de forma cruzada con las proteínas de la membrana externa de múltiples bacterias Gram negativas. Sin embargo, a la inversa, el tratamiento con antisuero dirigido contra IHF dio como resultado: 44 % de reducción en el grosor, 56 % de reducción en la biomasa y 52 % de reducción en la altura en comparación con el suero inalterado. Estos últimos efectos fueron estadísticamente significativos en comparación con el uso de medio estéril o suero inalterado (**Figuras 3G y 3H**). Para demostrar que el tratamiento con antisuero dirigido contra IHF no mató las bacterias residentes, lo que explica la perturbación observada de las biopelículas, después del tratamiento los inventores recuperaron tanto la subpoblación planctónica de bacterias contenidas en el medio de cultivo así como esa subpoblación bacteriana que permaneció dentro de la biopelícula y sometió ambas preparaciones a análisis por citometría de flujo para determinar la proporción relativa de bacterias vivas a muertas. Independientemente del tratamiento utilizado, los inventores descubrieron que ≥ 80 % de las bacterias dentro de la subpoblación planctónica y ≥ 93 % de las que permanecieron residentes dentro de la biopelícula eran viables. Este resultado sugirió que el tratamiento con anti-IHF mediaba la liberación de bacterias viables en la fase planctónica.

Para demostrar que la actividad de perturbación de la biopelícula observada tras el tratamiento con suero anti-IHF de conejo se debió principalmente a los anticuerpos IgG dirigidos contra IHF en este suero policlonal pero hiperinmune, los inventores enriquecieron este suero para IgG como se describe en Procedimientos (arriba) y luego analizaron tanto la fracción enriquecida para IgG (**Figura 3D**), así como la fracción de suero que fluyó a través de la columna (**Figura 3E y 3E**, así como las graficadas en **3G y 3H**, la preparación de antisuero enriquecida con IgG retuvo la actividad de el anti-IHF de conejo entero; sin embargo, no hubo capacidad del efluente de la columna de enriquecimiento para perturbar de manera similar la biopelícula. Se realizaron transferencias Western para demostrar que los anticuerpos contenidos tanto en el suero anti-IHF entero como en la fracción enriquecida para la proteína IHF purificada reconocida por IgG, así como las formas mono, di y triméricas de esta proteína dentro de los lisados de células enteras de la cepa K56-2 de *B. cenocepacia* (**Figura 3F**); el miembro de la familia DNABII, PG0121 (HUß de *Porphyromonas gingivalis*), también muestra la capacidad de mantener multímeros durante la SDS PAGE (S. Goodman, comunicación personal).

Demostración de interacción sinérgica entre anti-IHF y antibióticos tradicionales. Para determinar si la perturbación de la biopelícula mediada por anti-IHF podría ahora hacer que las bacterias residentes sean más susceptibles al tratamiento con otros agentes terapéuticos potenciales existentes, las biopelículas de *B. cenocepacia* preformadas se expusieron a cada uno de los siete antibióticos (usando la MIC determinada para cada uno contra la cepa K56-2 de *B. cenocepacia* cultivada planctónicamente como se describe en los Procedimientos experimentales, ya sea solo o en combinación con suero anti-IHF (a una dilución 1:50). Como se muestra en la **Figura 4** [usando la

incubación con ceftazidima (a 16 µg/ml) como ejemplo], mientras que el tratamiento con anti-IHF (**Figura 4D**) indujo una reducción en la altura, espesor y biomasa de la biopelícula sobre la de una biopelícula no tratada (**Figura 4A**), ninguno de estos tratamientos indujo mucha muerte de células bacterianas (**Figuras 4B y E**). Además, el tratamiento solo con antibióticos tuvo poco efecto observable sobre la biopelícula inducida por *B. cenocepacia* (**Figura 4G**), y aunque la muerte de las células bacterianas había aumentado con respecto a la observada después del tratamiento con medio estéril o anti-IHF solo, este efecto fue, sin embargo, mínimo (**Figura 4H**). Sin embargo, cuando se usaron juntos, hubo una reducción del 43 % en la altura (**Figura 4J**) y un aumento obvio y notable en la muerte celular bacteriana (como se indica por el color rojo/naranja) (**Figura 4K**) sobre lo observado cuando los antibióticos se usaron solos (compárense las **Figuras 4H y K**), lo que sugiere una interacción sinérgica entre anti-IHF y ceftazidima. Una reducción significativa en la altura promedio de la biopelícula (**Figura 4M**) y la biomasa (**Figura 4N**) entre el tratamiento con anti-IHF más antibiótico versus antibiótico solo se obtuvo de manera similar después del tratamiento de las biopelículas de *B. cenocepacia* con ciprofloxacina más anti-IHF, imipenem más anti-IHF y minociclina más anti-IHF ($p < 0,05$).

Demostración de que el uso de Pulmozyme (DNasa) puede estar contraindicado en pacientes con CF que están infectados con *B. cenocepacia*. El tratamiento con DNasa se usa como un estándar de atención para pacientes con CF, y dado que *B. cenocepacia* incorpora una gran cantidad de ADNe en su biopelícula, los inventores plantearon la hipótesis de que el uso de anti-IHF en combinación con DNasa también podría tener un efecto sinérgico. en términos de reducción de volumen y erradicación de bacterias dentro de una biopelícula inducida por *B. cenocepacia in vitro* como los inventores demostraron anteriormente que ocurre con NTHI (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4: 625-637). Sin embargo, este no fue el caso. De hecho, en múltiples ensayos repetidos, la exposición de una biopelícula de *B. cenocepacia* a DNasa indujo una biopelícula significativamente más robusta en términos de espesor promedio (**Figuras 5B y D**) que una tratada con diluyente solo (**Figura 5A**). Estas biopelículas tratadas con DNasa solo aumentaron ligeramente en altura máxima (comparar 32 µm a 28 µm), sin embargo, el aumento medio en la relación superficie a volumen fue del 12 %; el aumento medio de la biomasa fue del 174 % y en comparación con el espesor promedio, y la biopelícula formada por *B. cenocepacia* que había sido tratada con DNasa fue 204 % más espesa que la formada por *B. cenocepacia* que había sido tratada solo con diluyente. Mientras que el antisuero dirigido contra IHF todavía podía reducir efectivamente estas biopelículas mejoradas (**Figura 5C, D y E**), dados los resultados inesperados obtenidos con DNasa sola, la búsqueda de esta línea de investigación para el uso sinérgico potencial se volvió contraintuitiva. Es importante destacar que este resultado tiene implicaciones clínicas potenciales significativas para los pacientes con CF infectados con *B. cenocepacia*, ya que el uso repetido de DNasa en realidad puede exacerbar su enfermedad y contribuir al resultado clínico muy pobre que existe para estos pacientes.

Demostrar que la incubación de *B. cenocepacia* con anticuerpos dirigidos a una proteína DNABII pero no a suero inalterado da como resultado una recuperación bacteriana reducida de los macrófagos. *B. cenocepacia* puede persistir y replicarse dentro de los macrófagos de la CF murina y humana. Sin embargo, los macrófagos murinos WT o los macrófagos derivados de pacientes que no tienen CF restringen la infección por *B. cenocepacia* mediante el suministro del organismo al lisosoma para su degradación. Dado que recientemente se ha demostrado que el IHF asociada con *E. coli* uropatógena influye en la capacidad de esta bacteria para colonizar eficientemente la vejiga (Justice et al. (2012) PLoS One 7: e48349), los inventores se preguntaron si la incubación de *B. cenocepacia* con antisuero dirigido contra IHF podría influir en su interacción con los macrófagos, dada la importancia de esta célula huésped en la eliminación de bacterias del pulmón con CF. Usando una variante de la cepa K56-2 donde se introdujo la sensibilidad a la gentamicina (cepa MHK1); se determinó el número de *B. cenocepacia* que se multiplicó intracelularmente (después de matar las bacterias extracelulares mediante el tratamiento con gentamicina). Mientras que el número de *B. cenocepacia* asociada a macrófagos a las 2 horas después de la infección no fue significativamente diferente entre aquellos pretratados con suero inalterado versus aquellos pretratados con suero anti-IHF (a una dilución 1:1000) que sugirieron una absorción equivalente por los macrófagos en este momento, a las 6 horas después de la infección, *B. cenocepacia* pretratada con suero anti-IHF se vio significativamente impedida para el crecimiento dentro de los macrófagos con CF ($p < 0,05$) (**Figura 6**). Por lo tanto, el pretratamiento de *B. cenocepacia* con anti-IHF promovió su eliminación por macrófagos de CF; sin embargo, el mecanismo que subyace a esta observación queda por determinar y es objeto de una investigación en curso.

Demostración de la asociación de T3SS o T6SS con la incorporación de proteínas DNABII en la matriz de biopelícula de *B. cenocepacia*. Para comenzar a tratar de dilucidar los mecanismos moleculares mediante los cuales *B. cenocepacia* incorpora tanto proteínas ADNe como DNABII en sus biopelículas, los inventores incubaron biopelículas formadas en 24 horas por cualquiera de las cepas K56-2 de *B. cenocepacia* (aislamiento parental), la cepa JRL2 de *B. cenocepacia* ($\Delta bcsV$; mutante del sistema de secreción tipo III - T3SS) o la cepa DFA2 de *B. cenocepacia* ($\Delta BcsK$; mutante del sistema de secreción tipo VI - T6SS) con anticuerpo anti-IHF (Aubert et al. (2010) J. Biol Chem. 285: 35988-35998). En la biopelícula formada por el aislado parental, el marcado positivo se distribuyó a través de la biopelícula (**Figura 7A**) como se describió anteriormente. En la biopelícula formada por el mutante T3SS, mientras que la biopelícula en sí misma fue en general menos robusta que la formada por el aislamiento parental (biomasa 4,5 µm³/µm² en comparación con 18 µm³/µm² para el aislamiento parental; espesor promedio de 5,5 µm en comparación con 25,2 µm para el aislamiento parental), el marcado a través del suero anti-IHF estuvo nuevamente presente en toda la biopelícula, sin embargo, como se observó con el aislado parental, el etiquetado parecía ser mucho más fuerte en la base de la biopelícula (**Figura 7B**). Por el contrario, sin embargo, hubo muy

poco marcado de la biopelícula formada por el mutante T6SS (**Figura 7C**), la cual también fue significativamente menos robusta que la formada por el aislamiento parental (biomasa 2,9 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$; espesor 3,9 μm). Esta última observación no fue inesperada ya que se sabe que el T6SS de *B. cenocepacia* está asociado con la formación de biopelículas (Aubert et al. (2008) *Infect. Immun.* 76: 1979-1991). Sin embargo, colectivamente, estos datos sugirieron que la exportación de proteínas DNABII (y posiblemente también de ADN_e) dependía del T6SS de *B. cenocepacia*.

Dado el efecto que un mutante de T6SS tenía en la cantidad relativa de IHF y ADN_e presente en una biopelícula construida *in vitro* (**Figura 8**), los inventores cuestionaron si IHF posiblemente, podría actuar intracelularmente en *B. cenocepacia* para afectar la transcripción de la agrupación de genes T6SS (*BCAL0340* a *BCAL0348*; el gen *BcsK* es equivalente a *BCAL0342*). Como primera etapa a este respecto, se examinó la región corriente arriba de esta agrupación de genes y se identificó la secuencia TCTCAACGATTTA, una coincidencia casi perfecta con la secuencia consenso de unión a IHF WATCAANNNTTR (donde W es A o T, N es cualquier nucleótido y R es una A o G). En presencia de 50 nM de *E. coli* IHF, es visible una fuerte huella de DNasa (**Figura 7D**) que cubre la región de 25 a 52 pb corriente arriba de la secuencia de codificación de *BCAL0340* y superponiendo esta coincidencia con la secuencia de consenso. Este resultado podría indicar que IHF autorregula su propia liberación, así como quizás la del ADN_e que se incorpora a la matriz de biopelícula.

Discusión

La fibrosis quística (CF) es un ejemplo característico de una enfermedad crónica y persistente que desafía las modalidades de tratamiento actuales. Las biopelículas residentes en los pulmones de los pacientes con CF contribuyen significativamente tanto a la patogénesis como a la cronicidad. Una biopelícula es una comunidad multicelular altamente organizada encerrada en una matriz o sustancia polimérica extracelular (o EPS) que se fija a una superficie inerte o biológica y es el estilo de vida preferido de todas las bacterias en la naturaleza. Las poblaciones bacterianas dentro de una biopelícula, a diferencia de sus contrapartes planctónicas o de vida libre, tienen una tasa de crecimiento reducida (debido a la limitación de nutrientes), un transcriptoma distinto (Post et al. (2007) *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 15: 347-351; Post et al. (2004) *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 12: 185-190) y una resistencia sustancialmente mayor no solo a los efectores de inmunidad innata y adquirida, sino también a la acción de antibióticos (Slinger et al. (2006) *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 56: 247-253). Además, la EPS presenta una barrera física formidable para las células fagocíticas y otros mecanismos de eliminación bacteriana (tanto físicos como fisiológicos) y, por lo tanto, las biopelículas son altamente recalcitrantes a la erradicación (Flemming et al. (2010) *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 623-633). Las enfermedades en las que las biopelículas desempeñan un papel importante en la patogénesis y la cronicidad, tal como la CF, requieren por lo tanto procedimientos novedosos para el tratamiento y la prevención. Mientras que la composición de la EPS de las biopelículas es altamente diversa entre los géneros, además de estar influenciada por el entorno en el cual se forma, un componente muy común y crítico es la incorporación de ADN extracelular (ADN_e). Aunque el mecanismo mediante el cual el ADN_e es liberado por el microbio y/o se incorpora a la matriz de biofilm aún no se ha dilucidado para muchos patógenos, el ADN es no obstante, de gran interés tanto en términos de su funcionalidad biológica como de su papel como componente estructural de la biopelícula.

Aquí se divulga que la *Burkholderia cenocepacia* incorpora una gran cantidad de ADN_e en las biopelículas que forma. Es probable que la presencia de esta riqueza de ADN_e proporcione una protección excepcional a *B. cenocepacia* residentes como barrera física y, como se ha demostrado recientemente, el ADN_e dentro de una biopelícula también puede unir efectores de la inmunidad innata (Jones et al. (2012) *J Innate Immun.*), lo que limita o impide su acceso a las células bacterianas en su interior. Específicamente con respecto a *B. cenocepacia*, Peeters et al. (2008) *J. Hosp. Infect.* 70: 361-368) mostraron que *B. cenocepacia* sétil era altamente resistente a la clorhexidina, al peróxido de hidrógeno y al blanqueador al 5 %, incluso después del tratamiento durante 5 minutos. Además, el análisis de los datos de retiro de productos de la FDA para productos farmacéuticos no estériles de 1998-2006 mostró que el 48 % de los retiros del mercado se debieron a contaminación bien sea por *B. cepacia*, especies de *Pseudomonas* o *Ralstonia picketti* (Jimenez (2007) *PDA J. Pharm. Sci Technol.* 61: 383-399). Para productos no estériles y estériles, *B. cenocepacia* fue la especie aislada más frecuentemente. Colectivamente, estos datos indican que la contaminación por *B. cenocepacia* de superficies, equipos y dispositivos farmacéuticos, probablemente en forma de una biopelícula, sirve como fuente de infección no solo para los pacientes con CF, sino también para cualquier paciente hospitalizado, ventilado (Graindorge et al. (2010) *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 66:29-40; Lucero et al. (2011) *Am. J. Infect. Control.* 39:775-778) y/o inmunocomprometido sin CF (Vandamme et al. (1997) *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 1188-1200). Estas observaciones inspiraron el intento de desarrollar una novedosa estrategia inmunoterapéutica para pacientes con CF, particularmente aquellos infectados con *B. cenocepacia*. Para hacerlo, la atención se centró en el ADN_e y una familia de proteínas que se sabe que se unen a este ADN extracelular, las proteínas DNABII.

Aquí se divulga que *B. cenocepacia* incorpora una gran cantidad de ADN_e en sus biopelículas. Este ADN_e está asociado con una proteína DNABII que interactúa con el antisuero dirigido contra IHF nativo aislado producido por *E. coli*. Cuando se examinan las biopelículas de *B. cenocepacia* para determinar la distribución espacial de esta proteína DNABII, se encontró que, según lo observado para NTHI (Goodman et al. (2011) *Mucosal Immunol.* 4: 625-637), el marcado positivo se asoció con cada vértice de cadenas cruzadas de ADN_e presentes dentro de la biopelícula. Las biopelículas producidas por *B. cenocepacia* fueron susceptibles a la perturbación por suero anti-IHF pero no inalterado en un sistema de ensayo *in vitro*. Además, este efecto disruptivo del antisuero dirigido contra el

IHF hizo que las bacterias dentro de una biopelícula inducida por *B. cenocepacia* fueran susceptibles a la acción de matar de varios antibióticos tradicionalmente, pero usualmente ineficaz, utilizados para tratar pacientes con CF. Estos antibióticos no fueron efectivos o fueron significativamente menos efectivos para matar *B. cenocepacia* dentro de una biopelícula *in vitro* en ausencia de tratamiento con suero anti-IHF. Mientras que la acción del suero anti-IHF dio como resultado la perturbación de las biopelículas formadas por *B. cenocepacia* al direccionar a una proteína linchpin responsable de doblar y estabilizar el ADN en la estructura reticular vista dentro de estas biopelículas, no se encontró que la ADNasa fuera efectiva cuando se incubó con biopelículas de *B. cenocepacia in vitro*. De hecho, a diferencia del efecto reductor observado con las biopelículas formadas bien sea por NTHI (Gustave et al. (2012) J. Cyst. Fibros.) o *P. aeruginosa* (Whitchurch et al. (2002) Science 295: 1487), el tratamiento de una biopelícula de *B. cenocepacia* con DNasa indujo la formación de una biopelícula notablemente más robusta, lo que sugiere que el tratamiento de pacientes con CF que están infectados con *B. cenocepacia* estaría contraindicado. También se demostró que ese pretratamiento de *B. cenocepacia* con antisuero dirigido contra IHF parecía facilitar el enrutamiento de *B. cenocepacia* ingerida hacia una vía degradativa más efectiva dentro de los macrófagos de CF murina, ya que hubo un aumento estadísticamente significativo en la muerte de *B. cenocepacia* ingerida que fueron tratadas con anti-IHF a las 6 horas después de la infección que las que habían sido previamente incubadas con suero inalterado. Si bien aún no se conocen los mecanismos para esta observación, se plantea la hipótesis de que la unión de anti-IHF a IHF extracelular asociada a células bacterianas puede haber jugado un papel en este sentido. Por último, en un intento de comenzar a desentrañar el mecanismo molecular mediante el cual *B. cenocepacia* incorpora las proteínas tanto ADN como DNABII en su biopelícula, se examinaron las biopelículas construidas tanto por un mutante T3SS como T6SS del aislado de la cepa K56-2 utilizado aquí. Mientras que ambas biopelículas mutantes se vieron comprometidas en general en términos de robustez relativa de la biopelícula, la construida por el mutante T6SS estaba ausente de marcarse mediante antisuero dirigido contra IHF, lo que sugiere que la secreción de esta proteína, así como la formación de biopelícula robusta, dependía de una T6SS activa. Además, se identificó un supuesto sitio de unión a IHF directamente corriente arriba de la agrupación de genes T6SS, lo que sugiere que IHF puede regular su propia exportación. De hecho, un análisis transcriptomal formal de mutantes deficientes en IHF puede delinear además el papel de IHF en la patogénesis de *B. cenocepacia*; ya se sabe que el IHF es parte de la matriz extracelular y regula la expresión del factor de virulencia en *E. coli* uropatógena (Justice et al. (2012)). Los mecanismos que subyacen a estas observaciones se están investigando más a fondo.

A pesar de los enormes avances recientes en nuestra capacidad para manejar mejor a los pacientes con CF, solo se espera que estos individuos sobrevivan hasta los 30 años, incluso hoy. Al menos el 90 % de los pacientes con CF muere de insuficiencia respiratoria después de soportar muchos años de infección bacteriana crónica, recurrente y persistente de los pulmones. Las bacterias que habitan dentro de una biopelícula en los pulmones de los pacientes con CF presentan un obstáculo formidable. Por lo tanto, para diseñar estrategias novedosas y efectivas para tratar y/o prevenir mejor las infecciones bacterianas a largo plazo características de la CF, es necesario comprender tanto la biología única de las biopelículas, así como determinar cómo se pueden socavar estas estructuras para mediar en una "cura" terapéutica o preventiva. Aquí, demostramos que direccionar a una proteína bacteriana que estabiliza el ADN presente dentro de una biopelícula es altamente efectivo para reducir o erradicar esa estructura *in vitro*. Además, el tratamiento de una biopelícula inducida por *B. cenocepacia* con anti-IHF trabajó sinérgicamente con múltiples antibióticos estándar para hacer que las células bacterianas residentes sean sensibles a la muerte. Por último, los inventores descubrieron que el pretratamiento de *B. cenocepacia* con antisuero dirigido contra IHF inhibía significativamente su supervivencia cuando los macrófagos murinos con CF lo ingirieron. En base a los datos obtenidos hasta la fecha, un enfoque que se direcciona a las proteínas DNABII asociadas con el ADN dentro de una biopelícula de *B. cenocepacia* promete proporcionar un nuevo enfoque potencial para el tratamiento de pacientes con CF, y particularmente aquellos colonizados con *B. cenocepacia*. Lo más importante, dado que múltiples patógenos humanos parecen usar una estrategia similar en la que el ADN dentro de la biopelícula está asociado con un miembro de la familia DNABII de proteínas de unión a ácidos nucleicos, es probable que el enfoque desarrollado aquí tenga utilidad para otros patógenos del tracto respiratorio los cuales a menudo preceden y facilitar la infección por *B. cenocepacia* del pulmón con CF (George et al. (2009) FEMS Microbiol. Lett. 300: 153-164).

Experimento No. 2

50 Cepa bacteriana, formación de biopelículas, IHF y sueros

NTHI 86-028NP es un aislado clínico de paso mínimo cultivado de la nasofaringe de un niño sometido a inserción de un tubo de timpanostomía para otitis media crónica. Se ha descrito la formación de biopelículas de NTHI en portaobjetos de cubreobjetos con cámara de 8 pocillos (Jurcisek et al. (2011) J. Vis. Esp). Para todos los ensayos de biopelículas, se vieron pocillos duplicados en un microscopio confocal de escaneo Meta-láser Zeiss 510, imágenes compiladas con el software Zeiss Zen y valores de biomasa y/o grosor medio de biopelícula calculados con el software COMSTAT2 (Heydorn et al. (2000) Microbiology 146 (Pt10): 2395-2407). Todos los ensayos de biopelículas se repitieron un mínimo de tres veces, en días separados. Los datos representan la media + SEM.

E. coli IHF purificado y antisuero de conejo contra *E. coli*/IHF purificado ('anti-IHF_{*E. coli*}') fueron obsequios de Howard Nash (Granston et al. (1993) J. Mol. Biol. 234: 45-59; Rice et al. (1996) Cell 87: 1295-1306). Se adquirió suero de conejo ingenuo de Spring Valley Laboratories.

60 Cuantificación de IgG específica de IHF

La IgG específica de IHF se purificó a partir de suero policlonal usando columnas HiTrap Protein G HP (GE Healthcare). La cuantificación de IgG específica de IHF tanto anti-IHF_{E. coli} policlonal como enriquecido con IgG se determinó por transferencia de ranura versus IHF_{E. coli} purificado. Se generó una curva estándar usando suero de referencia de conejo versus IgG de conejo purificada (Bethyl Laboratories, Inc.) y la intensidad de la banda se analizó usando el software AlphaView (ProteinSimple).

Resolución de biopelículas maduras

Las biopelículas se establecieron durante 24, 48 y 96 horas, o 1 y 2 semanas. Para mantener la viabilidad bacteriana, el medio (caldo de infusión de cerebro y corazón suplementado con 2 µg ml⁻¹ de cada uno de β-NAD y hemo) se cambió dos veces al día. Las biopelículas se incubaron con medio anti-IHF_{E. coli} (una dilución 1:50, equivalente a 4,4 µg de IgG pocillo⁻¹ específica de IHF para biopelículas de ≤ 48 horas o una dilución 1:10, equivalente a 22,0 µg de IgG pocillo⁻¹ específica de IHF para biopelículas de ≥ 96 horas) o un volumen equivalente de suero inalterado. Después de 16 horas, las biopelículas se tiñeron con el kit de viabilidad bacteriana BacLight™ (Molecular Probes), se fijaron en una solución de paraformaldehído al 1,6 %, glutaraldehído al 2,5 % y ácido acético al 4,0 % en tampón fosfato 0,1 M y se vieron como se describe.

Cinética de resolución de biopelículas

Las biopelículas establecidas durante 24 h se incubaron bien sea con medio o con anti-IHF_{E. coli} o suero inalterado diluido 1:50 durante 0, 6, 12, 16 o 24 horas antes de la tinción de viabilidad y la fijación como se describe. Para el punto de tiempo de 0 h, se aplicó el tratamiento y luego se eliminó inmediatamente. Para mantener la viabilidad bacteriana de las biopelículas tratadas durante 24 horas, los tratamientos se reemplazaron después de 16 horas y se incubaron 8 horas adicionales. Para intentar erradicar por completo una biopelícula de 24 horas, se aplicó una dilución 1:5 de anti-IHF_{E. coli} o un volumen equivalente de suero inalterado.

Inhibición del contacto directo entre anticuerpos anti-IHF y biopelículas de NTHI

Anti-IHF_{E. coli} enriquecido con IgG se acopló covalentemente a perlas de agarosa (> 45 µm de diámetro) mediante el kit AminoLink Plus (Thermo Scientific). Para determinar si el contacto directo de anticuerpos anti-IHF_{E. coli} con la biopelícula se requirió para inducir la resolución, se establecieron biopelículas de 24 horas en placas de fondo óptico de 96 pocillos, luego se incubaron con: medio, dilución 1:50 de anti-IHF_{E. coli} o un volumen equivalente de suero inalterado, aplicado directamente a la biopelícula (80 µl de volumen total) o después de la inserción de untranspocillo HTS (Corning) de tamaño de poro de 5 µm en la placa de 96 pocillos, medio, 0,5-, 5,0- o 50,0 µg de anti-IHF_{E. coli} enriquecido con IgG covalentemente unido a perlas de agarosa, o un volumen igual de suero inalterado enriquecido con IgG unido a perlas de agarosa, se colocaron en la cámara apical (80 µl de volumen total). Las biopelículas se incubaron durante 16 h antes del procesamiento como se describe. Para confirmar que el anticuerpo específico de IHF no se difundió en la cámara basolateral, se recolectaron los sobrenadantes de la cámara basolateral y se analizaron mediante transferencia Western para determinar la reactividad al IHF_{E. coli} purificado.

Para determinar si la resolución de biopelículas por anti-IHF_{E. coli} podría bloquearse por impedimento estérico, se añadieron 80 µg de perlas de agarosa desnuda a la cámara apical una hora antes de colocar en capas 50,0 µg de anti-IHF_{E. coli} enriquecido con IgG unido a perlas o un volumen comparable de IgG enriquecido de suero inalterado acoplado a perlas. Las placas se incubaron 16 horas más, luego las biopelículas se tiñeron, se visualizaron y analizaron como se describe.

Para identificar si la capacidad del anticuerpo específico de IHF para secuestrar IHF libre estaba limitada por la accesibilidad relativa, se aplicaron 50,0 µg de anti-IHF_{E. coli} enriquecido con IgG conjugado con perlas o un volumen equivalente de IgG enriquecido de suero inalterado unido a perlas a la cámara apical de untranspocillo en el cual la cámara basolateral contenía una biopelícula de NTHI de 24 horas. Después de 6 h, los contenidos de la cámara apical se mezclaron mediante agitación, se incubaron durante 10 h adicionales, luego las biopelículas se tiñeron, se visualizaron y se analizaron como se describe.

Adsorción de anti-IHF_{E. coli}

Para neutralizar la reducción en volumen de biopelícula mediada por anti-IHF_{E. coli}, los anticuerpos específicos de IHF se adsorbieron del suero mediante incubación con IHF_{E. coli} purificado. Se incubaron alícuotas de anti-IHF_{E. coli} (4,4 µg de IgG específica de IHF) con 2,2 o 4,4 µg de IHF_{E. coli} purificado, diluyente salino o una proteína recombinante de masa molecular equivalente llamada "rsPilA" (Novotny et al. (2009) PLoS One 8: e67629), durante 1 hora. Se realizó la transferencia Western para confirmar la adsorción de anti-IHF_{E. coli}. Para evaluar la consecuencia funcional de la adsorción de anti-IHF_{E. coli}, los sueros adsorbidos se aplicaron luego a biopelículas de NTHI de 24 h por tratamiento estándar y protocolo de procesamiento.

Sinergia de anti-IHF_{E. coli} y antibióticos contra biopelículas de NTHI

Para visualizar los cambios en la viabilidad de las biopelículas de NTHI tras la exposición a los antibióticos típicamente utilizados para tratar las infecciones por NTHI, se establecieron biopelículas de 24 horas y se incubaron con una dilución 1:50 de anti-IHF_{E. coli} o suero inalterado, ampicilina (32,0 µg ml⁻¹), cefdinir (0,25 µg ml⁻¹) o

amoxicilina (1,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) más clavulanato-litio (0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) durante 16 horas. Cada antibiótico se usó en el MIC₉₀ para NTHI planctónico según se determinó mediante el procedimiento estándar de microdilución en caldo (Biedenbach et al. (2003) *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 46:55-61; Tristram et al. (2007) *Clin. Microbiol. Rev.* 20:368-389).

5 Para cuantificar NTHI adherente dentro de la biopelícula y las bacterias recién liberadas en la forma planctónica después del tratamiento, se incubaron biopelículas de 24 horas con cada antibiótico en el MIC₉₀ o una dilución de 4 u 8 veces, con o sin antisuero. Para cultivar el NTHI recientemente liberado, los sobrenadantes se recolectaron por aspiración, la biopelícula se lavó suavemente dos veces con solución salina estéril para eliminar las bacterias poco adherentes, y el NTHI dentro de la biopelícula se recuperó mediante pipeteado contundente. Las bacterias planctónicas y adherentes se colocaron en placas por separado para determinar la CFU NTHI ml^{-1} y estos valores se combinaron para demostrar las bacterias CFU totales como se muestra. Los datos representan la media + SEM de tres ensayos independientes.

Sinergia de anti-IHF_{E.coli} y antibióticos contra NTHI planctónico

15 Los NTHI se prepararon como se describe (Jurcisek et al. (2011) *J. Vis. Exp.*) y 10⁶ CFU NTHI se inocularon en los pocillos de una placa de 96 pocillos antes de la incubación con antibiótico en el MIC₉₀ o una dilución de 4 u 8 veces del mismo, con o sin dilución 1:50 de anti-IHF_{E.coli} o un volumen equivalente de suero inalterado. Después de 16 h, los cultivos se diluyeron en serie y se colocaron en placas sobre agar chocolate para semicuantificar CFU NTHI/pocillo. Los datos representan la media + SEM de tres ensayos independientes.

Mapeo de epítomos NTHI IHF

20 Para identificar regiones inmunodominantes dentro de IHF, se sintetizaron una serie de doce péptidos sintéticos de 20 meros con superposiciones de 5 residuos para imitar el terminal N a C de la subunidad α de IHF que se pronostica expresada por la cepa 86-028NP de NTHI ("IHF_{NTHI}"). La síntesis, la purificación y la confirmación de la secuencia de todos los péptidos sintéticos fue realizada por Ohio Peptide, LLC. Muestras archivadas de sueros policlonales recuperados de chinchillas que habían sido inmunizadas ya sea con IHF_{E.coli} nativo o IHF_{E.coli} previamente unido a un exceso de ADN bicatenario (Goodman et al. (2011) *Mucosal. Immunol.* 4: 625-637) se usaron para mapear epítomos inmunodominantes de IHF. El análisis de la interacción entre los péptidos sintéticos IHF_{NTHI} y los anticuerpos presentes en los sueros de chinchilla se determinó utilizando un Biacore 3000 (GE Healthcare) como se describe (Novotny et al. (2000) *Infect. Immun.* 68: 2119-2128; Novotny et al. (2009) *Vaccine* 28: 279-289). La reactividad de los sueros de chinchilla a péptidos de IHF_{NTHI} se procesó utilizando el software PyMol (Schrödinger) para generar imágenes de modelos en 3D.

30 Evaluación de antisueros específicos de epítomo de IHF_{NTHI} para perturbar las biopelículas de NTHI

En base a los resultados obtenidos del estudio de mapeo del epítomo, se seleccionaron dos regiones dentro de la subunidad α de IHF_{NTHI} para generar antisuero policlonal de chinchilla: *IhfA*-3_{NTHI} (una región no reactiva) e *IhfA*-5_{NTHI} (reactivo por anticuerpos contra IHF_{E. coli} pero no reactivo por anti-IHF_{E. coli} preunido a ADN). Las biopelículas de NTHI establecidas durante 24 horas se trataron con dilución 1:50 de los siguientes sueros de chinchilla: anti-IHF_{E.coli}, anti-IHF_{E.coli} previamente unidos al ADN, suero inalterado, anti-*IhfA*-3_{NTHI} o anti-*IhfA*-5_{NTHI} durante 16 horas antes de la tinción y evaluación. El trabajo con animales se realizó siguiendo la NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals y bajo un protocolo aprobado por el Nationwide Children's Hospital Institutional Animal Care and Use Committee..

Análisis estadístico

40 Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism. Las comparaciones de biomasa y espesor de biopelículas se determinaron mediante el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey establecida en 5 %. Las diferencias significativas en CFU NTHI después del tratamiento se determinaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Holm-Sidak para comparaciones múltiples; un valor $p \leq 0,05$ se consideró significativo.

45 Resultados

Resolución inducida por anti-IHF de biopelículas de NTHI

El trabajo anterior demuestra que el antisuero policlonal de conejo contra *E. coli* IHF (o "anti-IHF_{E. coli}") utilizado a una dilución 1:50, equivalente a 4,4 μg de IgG específica de IHF ml^{-1} , perturba una biopelícula de NTHI de 24 horas en *in vitro* (Goodman et al. (2011) *Mucosal Immunol.* 4: 625-637). Luego se examinó la efectividad relativa de anti-IHF_{E. coli} tanto en biopelículas de NTHI maduras como de formación temprana. Las biopelículas formadas durante 16, 24, 48 o 96 horas y 1 o 2 semanas antes del tratamiento mostraron una marcada disminución en la biopelícula restante después de la incubación con anti-IHF_{E. coli}, mientras que las biopelículas expuestas al suero inalterado fueron comparables a las mantenidas en medio (**Figura 10A**). Cuantitativamente, biomasa de biopelículas de 16, 24 y 48 horas expuestas a anti-IHF_{E. coli} se redujeron significativamente 94 %, 86 % y 74 %, respectivamente, en comparación con suero inalterado ($p < 0,05$, **Figura 10B**). Para lograr un efecto similar contra las biopelículas más maduras, anti-IHF_{E. coli} se diluyó 1:10. En consecuencia, las biomasa para las biopelículas de 96 horas o de 1 o 2

semanas se redujeron significativamente en un 74 %, 43 % y 57 %, respectivamente, en comparación con el suero inalterado ($p < 0,01$ o $0,05$). A medida que las biopelículas de NTHI maduran *in vitro*, aumenta la cantidad relativa de ADN_e (Jones et al. (2013) *J. Innate Immun.* 5: 24-38), por lo que no fue inesperado que se requiriera una mayor concentración de antisuero específico de IHF para lograr una reducción similar en la biomasa de estas biopelículas “más antiguas” y más densas. Colectivamente, estos datos demostraron que anti-IHF_{E. coli} fue significativamente efectivo y capaz de perturbar las biopelículas de NTHI maduras y de formación temprana.

Luego se examinó la cinética de la perturbación mediada por anti-IHF. La biopelícula establecida durante 24 horas se trató posteriormente durante 0, 6, 12, 16 o 24 horas con medio o anti-IHF_{E. coli} o suero inalterado a una dilución de 1:50. La aplicación, luego la eliminación instantánea de los tratamientos no indujo alteración en la biomasa de biopelícula con respecto al medio (**Figuras 11A y 11B**). Sin embargo, las biopelículas expuestas a anti-IHF_{E. coli} durante 6, 12, 16 o 24 h demostraron una reducción del 76 %, 43 %, 65 % o 67 % en la biomasa en comparación con el suero inalterado, respectivamente ($p < 0,01$) con una reducción máxima observada en el punto de tiempo de 6 h. Anteriormente se informó que el efecto fue modesto del suero inalterado de animales sin SPF en comparación con las biopelículas mantenidas en medio (Goodman et al. (2011) *Mucosal Immunol.* 4: 625-637; Novotny et al. (2013) *PLoS One* 8: e67629). A continuación, los inventores examinaron si una mayor concentración de anti-IHF_{E. coli} o un tiempo de exposición prolongado podría reducir además, o erradicar una biopelícula preformada. La incubación de biopelículas de NTHI con anti-IHF_{E. coli} diluido 1: 5 dio como resultado una disminución de la biomasa en un 86 % en comparación con el suero inalterado ($p < 0,01$; **FIGS. 11A y 11B**). Este resultado parecía máximo ya que ni una mayor concentración de anti-IHF_{E. coli} ni un aumento en el tiempo de tratamiento a 24 h erradicaron completamente todas las bacterias viables. En cualquier caso, quedaba una sola capa de bacterias después del tratamiento, lo que sugería que no había un direccionamiento para anti-IHF_{E. coli} en estas monocapas.

No se requirió contacto directo para que anti-IHF perturbara las biopelículas de NTHI

Hasta este punto, el anti-IHF se aplicó directamente a las biopelículas de NTHI. Para determinar ahora si se requirió el contacto directo entre anti-IHF_{E. coli} y la biopelícula, se establecieron biopelículas de NTHI en la cámara basolateral de untranspocillo. Anti-IHF_{E. coli} enriquecido con IgG covalentemente unido a perlas de agarosa se colocó en la cámara apical, separando así físicamente los anticuerpos de la biopelícula por la presencia de una membrana. Los inventores primero confirmaron que anti-IHF_{E. coli} acoplado a perlas de agarosa no se difundió en la cámara basolateral mediante la recolección de medio dentro de la cámara basolateral 24 horas después de la colocación de perlas unidas a anticuerpos en la cámara apical deltranspocillo mediante transferencia Western (**Figura 18**). En comparación con la aplicación de IHF_{E. coli} directamente a la biopelícula (**Figura 12A**), la reducción de la biopelícula en presencia de anti-IHF_{E. coli} enlazado a perlas de agarosa dentro de la cámara apical deltranspocillo fue equivalente (**Figura 12C**), y se observó una reducción significativa en la biomasa ($p < 0,05$) en comparación con la IgG enlazada del suero inalterado (**Figuras 12B y 12F**). Aunque se ensayaron tres concentraciones de anticuerpos acoplados a perlas de agarosa, y todas fueron efectivas, no se observó perturbación de la biopelícula dependiente de la dosis. Estos datos sugieren una saturación de los sitios de unión de anticuerpos disponibles en la interfaz entre el medio de biopelícula y la membrana transpocillo. Para probar esta teoría, se colocó una capa de perlas de agarosa desnuda debajo de aquellas a las que los anticuerpos IHF_{E. coli} se habían unido, bloqueando estéricamente la capacidad de unirse a el IHF 'libre'. Como se anticipó, no se observó perturbación de la biopelícula (**Figuras 12D y 12F**). Sin embargo, la perturbación de la biopelícula se restableció al mezclar las perlas desnudas y los anticuerpos unidos a anti-IHF (**Figura 12E**). Colectivamente, estos datos demostraron que anti-IHF_{E. coli} no requirió contacto directo con una biopelícula de NTHI para mediar la perturbación, y además, que esta perturbación probablemente fue mediada por un desplazamiento de equilibrio forzado ya que los anticuerpos capturan IHF libre cuando esta proteína se disocia naturalmente del ADN_e dentro de la biopelícula (es decir, estaba en un estado 'apagado').

Para demostrar que la perturbación de la biopelícula observada estuvo mediada específicamente por anticuerpos dirigidos contra IHF y no debido a la influencia de otros componentes dentro del suero de conejo hiperinmune (ya que este suero no se activó por calor antes del uso) se adsorbieron alícuotas de anti-IHF_{E. coli} bien sea con IHF purificado, o como control negativo, una proteína NTHI de masa molecular comparable llamada rSPiIA (Novotny et al. (2009) *Vaccine* 28: 279-289). Los inventores establecieron primero que la dilución 1:50 de antisuero seleccionada arbitrariamente utilizada en los ensayos de biopelículas equivalía a la aplicación de 4,4 µg de IgG específica de IHF a cada biopelícula. La transferencia Western reveló una reactividad reducida del anticuerpo específico de IHF después de la incubación con concentraciones crecientes de IHF purificado (**Figura 19**). Este resultado fue específico, ya que no se observó disminución de la reactividad por incubación con la proteína NTHI recombinante no relacionada. Además, la incubación de biopelículas con los sueros adsorbidos con IHF mostró una capacidad reducida para perturbar eficazmente las biopelículas preformadas, en comparación con el suero entero (**Figuras 13A y 13B**). Estos datos revelaron que la perturbación de la biopelícula de NTHI observada estaba mediada por anticuerpos específicos de IHF dentro del suero de conejo policlonal.

Sinergia de anti-IHF con antibióticos

Los inventores luego examinaron si la perturbación de la biopelícula por anti-IHF_{E. coli} aumentó la susceptibilidad de las bacterias residentes en la biopelícula a la muerte por antibióticos comúnmente utilizados para tratar infecciones por NTHI. La concentración inhibitoria mínima requerida para inhibir el crecimiento del 90 % (MIC₉₀) de NTHI cultivado planctónicamente se determinó previamente (Tristram et al. (2007) *Clin. Microbiol. Rev.* 20: 368-389) y se

emplearon las siguientes concentraciones: ampicilina (32 $\mu\text{g ml}^{-1}$), amoxicilina-clavulanato (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente) y cefdinir (0,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$). las biopelículas de NTHI de veinticuatro horas fueron expuestas a anti-IHF_{E. coli}, diluido 1:50, antibiótico o una combinación de anti-IHF_{E. coli} más antibiótico. Como se anticipó, anti-IHF_{E. coli} medió la perturbación significativa de la biopelícula (**Figura 14A**), sin embargo, la incubación con cualquiera de los tres antibióticos en la MIC₉₀ para NTHI planctónico no dio como resultado la muerte bacteriana según lo determinado por la tinción de viabilidad (**Figuras 14B-14D**) y el espesor medio de la biopelícula y la biomasa fue comparable entre medio y antibiótico solo (**Figura 14E**). Notablemente, el tratamiento de una biopelícula de NTHI establecida con una combinación de anti-IHF_{E. coli} y cualquiera de los tres antibióticos indujeron una alteración marcada en la arquitectura de biopelícula y una reducción estadísticamente significativa en la biomasa media ($p \leq 0,05$), en comparación con el tratamiento con antibiótico solo. Además, se observó muerte bacteriana dentro de las biopelículas tratadas con anti-IHF_{E. coli} más cualquiera de los tres antibióticos. Estos datos sugirieron que la perturbación mediada por anti-IHF de las biopelículas de NTHI hizo que las bacterias residentes fueran más susceptibles a las acciones de antimicrobianos previamente ineficaces.

Para ampliar esta línea de investigación más allá de los datos descriptivos de la perturbación física de las biopelículas preformadas, se examinó si la exposición a anti-IHF_{E. coli} aumentó la muerte mediada por antibióticos de la bacteria recién liberada. Para hacerlo, los tres antibióticos direccionados se analizaron tanto en la MIC₉₀ para NTHI planctónico (Biedenbach et al. (2003) Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 46: 291-294; Tristram et al. (2007) Clin. Microbiol. Rev. 20: 368-389) así como a una dilución de 4 u 8 veces de la misma. Cuando se incubó con cualquiera de los tres antibióticos en la MIC₉₀, no se observó diferencia significativa en las bacterias adherentes de unidades formadoras de colonias (CFU) ml^{-1} con respecto al medio (**Figuras 15A-15C**). Sin embargo, además de anti-IHF_{E. coli} dio como resultado una reducción significativa en el número de NTHI que permaneció adherente al portaobjetos de la cámara en comparación con el medio ($p < 0,05$) (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4: 625-637). Además, el uso de cualquier antibiótico en la MIC₉₀ en combinación con anti-IHF_{E. coli} indujo una reducción significativa aún mayor en el número de bacterias adherentes ($p < 0,05$) en relación con el medio solo. Esta reducción se mantuvo a concentraciones 8 veces menores de ampicilina (4 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y amoxicilina-clavulante (0.125 y 0,0625 $\mu\text{g cada ml}^{-1}$), así como a una concentración 4 veces menor de cefdinir (0,0625 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

Para demostrar que la perturbación de las biopelículas por anti-IHF_{E. coli} mediaba la destrucción mejorada de bacterias tanto en las poblaciones adherentes como en las planctónicas, se examinó el total de bacterias viables por pocillo después del tratamiento con cada antibiótico administrado con o sin anti-IHF_{E. coli} (**Figuras 16D-16F**). Para todos los antibióticos, se observó una reducción significativa en la CFU NTHI/pocillo de portaobjetos de cámara total viable cuando el antibiótico se usó bien sea en la MIC₉₀ o en una dilución de 4 u 8 veces del mismo en combinación con una dilución 1:50 de anti-IHF_{E. coli}. En todos los casos, estas diferencias fueron significativas en comparación con el tratamiento con antibiótico solo, anti-IHF_{E. coli} solo o antibiótico más suero inalterado ($p < 0,05$).

Para determinar si los NTHI recientemente liberados, o quizás aquellos que todavía están en una asociación menos estricta con la biopelícula perturbada, eran inusualmente susceptibles a la acción de estos antibióticos, los cultivados en caldo de NTHI se trataron con una dilución 1:50 de cualquiera de los anti-IHF_{E. coli} o suero inalterado, suministrado solo o en presencia de ampicilina, amoxicilina/clavulanato o cefdinir. Se usaron antibióticos tanto en la MIC₉₀ para NTHI planctónico como para una dilución de 4 u 8 veces del mismo. No se observó mejora de la muerte mediada por antibióticos tras la exposición de NTHI cultivado en plancton a anti-IHF_{E. coli} solo (**Figuras 20A-20C**), lo que sugiere que NTHI recién liberado de la biopelícula por la acción de anti-IHF_{E. coli} fueron fenotípicamente únicos, ya sea de su biopelícula o sus contrapartes planctónicas.

Identificación de regiones inmunodominantes dentro de IHF

El trabajo previo demostró que la inmunización de las chinchillas con IHF_{E. coli} nativo indujo la formación de anticuerpos que resolvieron rápidamente las biopelículas de NTHI establecidas dentro de los oídos medios de la chinchilla durante la OM experimental; sin embargo, la inmunización con IHF_{E. coli} que se había complejado previamente con el ADN (la forma probablemente presente en la naturaleza, durante la enfermedad) no resolvió la enfermedad (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4: 625-637). Colectivamente, los datos hasta la fecha implican que existe un dominio conservado dentro de las proteínas DNABII (IHF y HU) de muchas bacterias las cuales pueden ser direccionadas para perturbación efectiva de la estructura de la biopelícula y que este dominio está enmascarado u ocluido cuando IHF/HU está asociado con ADN. Para determinar la ubicación de este dominio efectivo/enmascarado, IHF de NTHI (denominado como "IHF_{NTHI}") se mapeó con epítomos utilizando una serie de péptidos superpuestos de 20 meros diseñados para imitar el terminal N a C deducido de la subunidad α de esta proteína DNABII. Estos péptidos se cribaron con antisueros recuperados de chinchillas que se habían inmunizado con ya sea IHF_{E. coli} nativo o IHF_{E. coli} que se había complejado con un exceso de ADN (Goodman et al. (2011) Mucosal Immunol. 4: 625-637). El antisuero contra IHF_{E. coli} nativo fue reactivo con péptidos predichos para representar las regiones de la punta de unión al ADN (**Figura 16A**), mientras que el antisuero contra el complejo IHF_{E. coli}-ADN produjo la mayor reactividad a los péptidos que representan las colas N-terminales de IHF_{NTHI} (**Figura 16B**). Este resultado fue lógico ya que las regiones de la punta de unión al ADN probablemente están ocluidas cuando IHF_{E. coli} se une al ADN como se muestra en la **Figura 16C**; por lo tanto, mientras que la región de la cola está expuesta, se predice que las regiones de unión de la punta son inmunológicamente inaccesibles.

Como nuestro estudio de mapeo con epítomos reveló regiones específicas dentro de la molécula de IHF a las que los anticuerpos del suero eran reactivos, los inventores trataron de determinar si los anticuerpos dirigidos contra este epítomo direccionado eran tan efectivos como los dirigidos contra la proteína nativa. Para hacerlo, se seleccionaron dos péptidos con los cuales generar suero inmune en chinchillas: el péptido *IhfA*-5_{NTHI}, que representa la región de unión a la punta del ADN reactivo dentro de la subunidad α de IHF (**Figura 16D**) y como control negativo, *IhfA*-3_{NTHI}, que representa un péptido de igual tamaño pero que no reaccionó mediante mapeo con epítomos (**Figura 16D**). IHF_{E.coli} purificado y IHF_{E.coli} pre-complejado con ADN sirvieron como inmunógenos comparativos. Como se esperaba, en comparación con el suero de chinchilla ingenuo, las biopelículas de NTHI incubadas con anti-IHF_{E.coli} complejado con ADN o anti-*IhfA*-3_{NTHI} no se alteraron en la morfología de la biopelícula o la biomasa (**Figura 16E y 16F**). Sin embargo, de manera similar a la observada con anti-IHF_{E.coli}, la incubación con anti-*IhfA*-5_{NTHI} fue igualmente eficaz para inducir una reducción significativa en la biomasa de biopelículas ($p < 0,01$) en comparación con el suero inalterado.

Discusión

Las biopelículas bacterianas contribuyen significativamente a la mayoría de las enfermedades bacterianas recurrentes y crónicas, incluidas las del tracto respiratorio, el tracto urogenital y la cavidad oral. Las biopelículas son recalcitrantes a la acción del sistema inmunitario del huésped y los agentes antimicrobianos, lo que requiere el desarrollo de novedosas modalidades de tratamiento para enfermedades con un componente de biopelícula. El ADN es un componente prevalente de la EPS de biopelícula de muchos microbios, y previamente demostramos que los miembros de la familia de proteínas DNABII juegan un papel crucial en la estabilización de la estructura de la biopelícula, ya que la exposición de las biopelículas a los anticuerpos dirigidos contra IHF media una perturbación significativa (Goodman et al. (2011) *Mucosal Immunol.* 4: 625-637).

A medida que envejece la biopelícula de NTHI, hay un aumento en la concentración de ADN dentro de la EPS (Jones et al. (2013) *J. Innate Immun.* 5: 24-38), y por inferencia, un aumento relativo concordante en la concentración de proteínas DNABII asociadas. Aquí mostramos que las biopelículas más antiguas requerían una mayor concentración de anti-IHF_{E.coli} para mediar la perturbación. La capacidad de anti-IHF_{E.coli} para alterar una biopelícula de NTHI de 24 horas establecida fue rápida, con efectos máximos ocurridos dentro de las 6 horas de exposición (76 % de reducción en la biomasa y 71 % de reducción en el grosor medio en comparación con el suero inalterado) y no se produjo más perturbación después de una incubación adicional de 24 horas con un solo tratamiento. Independientemente del aumento relativo en la concentración de anticuerpos anti-IHF_{E.coli} o el tiempo de exposición, no se pudo lograr la erradicación completa de NTHI. En cambio, permaneció una monocapa de bacterias viables, lo que sugiere que, en ausencia de una EPS que contenga ADN e IHF, no existe un direccionamiento para la terapia dirigida anti-IHF.

Por lo tanto, un enfoque combinatorio probablemente sería ideal y daría como resultado la capacidad de usar antibióticos ya existentes u otras terapias para resolver estas enfermedades.

Para definir mejor el mecanismo de acción, se investigó si era necesario el contacto directo entre la biopelícula y los anticuerpos anti-IHF_{E.coli} para la perturbación de la biopelícula, ya que previamente se planteó la hipótesis que ese no era el caso (Goodman et al. (2011) *Mucosal Immunol.* 4: 625-637). Como se esperaba, la separación de los anticuerpos enlazados a las perlas de agarosa de la biopelícula por una membrana microporosa no inhibió la perturbación de la biopelícula, lo que sugiere que no era necesario el contacto directo. En cambio, colectivamente los datos indicaron que los anticuerpos dirigidos contra anti-IHF_{E.coli} capturaron IHF libre, ya que se disociaba del ADN dentro de la biopelícula como parte del equilibrio normal entre el IHF y el ADN. De hecho, los experimentos de mapeo con epítomos apuntan a la inhibición competitiva del dominio de unión al ADN de IHF como el sitio de acción del anticuerpo. La presencia de un exceso de anticuerpos contra el IHF desplaza así este equilibrio, mediando el colapso o la perturbación de la estructura de la biopelícula.

Como el tratamiento de una biopelícula con anti-IHF media la liberación de bacterias en la fase planctónica (Goodman et al. (2011) *Mucosal Immunol.* 4: 625-637), se probó si anti-IHF anti-IHF_{E.coli} podría actuar de manera combinatoria con antibióticos tradicionales para aumentar su capacidad de matar. Para tres antibióticos utilizados tradicionalmente para tratar infecciones recalcitrantes del tracto respiratorio debido a NTHI, se determinó que en efecto este era el caso. El tratamiento de biopelículas establecidas con anti-IHF_{E.coli} más antibiótico hace que las bacterias residentes sean susceptibles de matar. Además, estas bacterias recientemente liberadas demostraron una mayor susceptibilidad a la muerte que no se debió a la exposición a anti-IHF_{E.coli} solo. Los tres antibióticos probados fueron capaces de mediar la muerte cuando se usaron en una concentración de 4 a 8 veces menor que la MIC₉₀ para células en crecimiento planctónico, lo que demuestra una verdadera sinergia. Estos hallazgos también sugirieron la posibilidad de un fenotipo único para NTHI que había sido liberado recientemente del crecimiento de biopelículas, en comparación bien sea con los residentes dentro de una biopelícula o con crecimiento planctónico. Es importante destacar que se ha hecho una observación similar para *S. pneumoniae* en el trabajo pionero de Anders Hakansson, quien descubrió que los neumococos liberados de las biopelículas, mediadas a través de varios tratamientos, tienen un transcriptoma único y una mayor virulencia en comparación con ambas bacterias que crecen como una biopelícula así como con bacterias planctónicas que crecen en medio rico (Marks et al. (2013) *MBio.* 4).

5 Colectivamente, estos datos apoyan un modelo para describir el mecanismo mediante el cual el antisuero contra el IHF induce la perturbación de una biopelícula establecida. La exposición de biopelículas a anti-IHF induce un desplazamiento de equilibrio entre las moléculas de IHF unidas al ADN dentro de una biopelícula (o "encendido") y aquellas en un estado "apagado". Las moléculas de IHF libres en el medio acuoso circundante se eliminan, lo que obliga al IHF unido a disociarse del ADN de la biopelícula, lo que media un colapso estructural de la biopelícula. Estas observaciones demuestran el potencial para direccionar a una molécula de importancia estructural crítica para la integridad de la biopelícula para el tratamiento de múltiples enfermedades con un componente de biopelícula.

10 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Todas las secuencias de nucleótidos proporcionadas en el presente documento se presentan en la dirección 5' a 3'.

15 Las invenciones descritas ilustrativamente en el presente documento pueden practicarse adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no divulgados específicamente en el presente documento. Así, por ejemplo, los términos "que comprende", "que incluye," que contiene ", etc., se leerán de manera expansiva y sin limitación. Además, los términos y expresiones empleados en este documento se han usado como términos de descripción y no de limitación, y allí no existe ninguna intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del ámbito de la invención reivindicada.

La descripción y los ejemplos anteriores pretenden ilustrar y no limitar el alcance de la invención.

Tabla 1

Gram (+) – solamente HU, Gram (-) - todos tienen HU algunos también IHF

Cepas de Bacterias	Abreviatura	Nombre de la proteína	de la
<i>S. sobrinus</i> 6715	<i>Ss</i>	1310	(HU) (no completamente secuenciado)
<i>S. pyogenes</i> MGAS10270	<i>Spyog</i>	Spy1239	(HU)
<i>S. gordonii</i> Challis NCTC7868	<i>Sg</i>	SGO_0701	(HlpA)
<i>S. agalactiae</i> (Grupo B GBS Strep)2603V/R		SAG_0505	(Hup)
<i>S. mutans</i> UA159	<i>Sm</i>	Smu_589	(HU)
<i>S. pneumoniae</i> R6	<i>Spneu</i>	spr1020	(HU)
<i>S. gallolyticus</i> UCN34 (<i>S. bovis</i>)	<i>Sgall</i>	YP_003430069	(HlpA)
<i>S. aureus</i> MW2	<i>Sa</i>	MW1362	(HU)
<i>S. epidermidis</i> RP62A	<i>Se</i>	SERP1041	(Hup)
<i>E. coli</i> K12-MG1655	<i>Ec</i>	b1712	(HimA)
		b0912	(HimD)
			(HupA)
			(HupB)
<i>H. influenza</i> KW20 Rd	<i>Hi</i>	HI1221	(HimA)

ES 2 746 971 T3

(continuación)

Gram (+) – solamente HU, Gram (-) - todos tienen HU algunos también IHF

Cepas de Bacterias	Abreviatura	Nombre de la proteína	
		HI1313	(HimD)
		HI0430	(HupA)
<i>Salmonella enteric serovar typhi CT18</i>	<i>Salm</i>	Sty1771	(HimA)
		Sty0982	(HimD)
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans D11S-1</i>	<i>Aa</i>	YP_003255965	(IHF α)
		YP_003256209	(IhfB)
		YP_003255304	(HU)
<i>P. gingivalis</i> W83	<i>Pg</i>	PG_0121	(Hup-1)
		PG_1258	(Hup-2)
<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090 (Oklahoma)	<i>Ng</i>	NGO603	(IHF β)
		NGO030	(IHF α)
<i>N. meningitidis</i> MC58	<i>Nm</i>	NMB_0729	(HimA)
		NMB_1302	(HimA)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pa</i>	PA3161	(HimD)
		PA1804	(HupB)
		PA2758	(HimA)
<i>H. pylori</i> 26695	<i>Hp</i>	Hp0835	(Hup)
<i>B. burgdorferi</i> B31	<i>Bb</i>	BB_0232	(Hbb)
<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4	<i>Mc</i>	YP_003626307	(HimA)
		YP_003627027	(HimD)
		YP_003626775	(HupB)
<i>V. cholera</i> El Tor N16961	<i>Vc</i>	VC_0273	(HupA)
		VC_1914	(HipB)
		VC_1919	(HupB)

(continuación)

Gram (+) – solamente HU, Gram (-) - todos tienen HU algunos también IHF

Cepas de Bacterias	Abreviatura	Nombre de la proteína	
		VC_1222	(HimA)
<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424	<i>Bc</i>	Bcen2424_1048	(IHFB)
		Bcen2424_1481	(IHFA)
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668	<i>Bp</i>	BURPS668_2881	(IHFB)
		BURPS668_1718	(IHFA)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Mtb CDC1551		MT_3064	(HU)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2	<i>Ms</i>	MSMEG_2389	(Hup)
<i>Treponema denticola</i> ATCC 35405	<i>Td</i>	TDE_1709	(HU)
<i>Treponema palladum</i> Nichols	<i>Tp</i>	TP_0251	(proteína II de unión a ADN)
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845	<i>Pm</i>	PREME0022_2103	(HupB)
		PREME0022_0268	(HupA)
		PREME0022_0341	(Hup)
		PREME0022_0340	(HimA)
<i>Prevotella intermedia</i> 17	<i>Pi</i>	PIN_A0704	(Hup)
		PIN_A1504	(Hup-2)
		PIN_0345	(HimA)
		PIN_0343	(Proteína hipotética)
<i>Bordetella pertusis</i> Tohama 1	<i>Bpert</i>	BP2572	(IhfA)
		BP3530	(HupB)
		BP0951	(IhfB)
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	<i>Ef</i>	Ef1550	(hup)

2	2 (cont.)
---	--------------

SEQ ID NOS 42-72, respectivamente, en orden de aparición

Ec_HimA	-----MALT	KAEMSEYLF	DKLG-LS	-----K	DAKELVEL	FFFEI	RRAL	EN		
Salm_HimA	-----MALT	KAEMSEYLF	DKLG-LS	-----K	DAKELVEL	FFFEI	RRAL	EN		
Vc_HimA	-----MALT	KAELAEALF	EQLG-MS	-----K	DAKDTVE	VFFFEI	RKALE	S		
Pa_HimA	-----MGALT	KAETAEERLY	EELG-LN	-----K	EAKELVEL	FFFEI	RQALE	H		
Hi_HimA	-----MATIT	KLDIIEYLS	DRYH-LS	-----K	DTKNVVEN	FLEEI	RLSLE	S		
Aa_IHFalpha	-----MTLT	KVELAENLIE	KFH-LS	-----K	EARDLVE	SFFFEI	RVALE	T		
Mc_HimA	-----MGALT	KADMVDEL	TIRLR-LT	-----R	QARKLVD	GGFFEI	SQSLA	Q		
Ng_IHFalpha	-----MTLT	KAELADILN	DKVSNVT	-----K	DAKEIVEL	FFFEI	RSTLA	S		
Nm_HimA	-----MTLT	KAELADILN	DKVSNVT	-----K	DAKEIVEL	FFFEI	RSTLA	S		
Bc_IHFA	+30aa	ASTE-TPTLT	KAELAEELF	DSVG-LN	-----K	EAKDMVE	AFFFEI	RVDALE	N	
Bp_IHFA	+27aa	TSAGDTPTLT	KAELAEELF	DSVG-LN	-----K	EAKDMVE	AFFFEI	RVDALE	N	
Bpert_IhfA	MGT	TMLAEPRTL	KAELAEELF	ERVG-LN	-----K	EAKDIVD	TFFEI	RDALAR		
Pm_HimA	-----M	NKEFIAAL	AARTGYT	-----Q	DESQ	KMVK	TVDD	MMGKSF	E	
Pi_HimA	-----M	NKEFITAL	ANRVGRS	-----Q	LETQ	KLVK	TALQ	AMGDN	F	
Tp_Dbp II	-----M	KRVRRT	RSFVWDAL	CDEV	DLS	-----R	HVARV	VDSFV	SVVTA	A
Pm_Hup	-----M	KSAIQ	LITSALAK	QHNLS	-----A	DDAA	FVDA	FFDI	ISS	E
Pi_hypo	-----M	KTALQ	LIADAVAK	KHKIT	-----V	EAEK	FVSA	IFDV	VNEGL	K
Sa_HU	-----M	NKTDLIN	AVAEQ	ADLT	-----K	EAGSA	VD	AVF	FEI	Q
Ec_hupA	-----M	NKTQLID	VIAEKA	ELS	-----K	TQAKA	ALE	STL	AAIT	E
Se_Hup	-----M	NKTDLIN	AVAEQ	ADLT	-----K	EAGSA	VD	AVF	FEI	Q
Ss_Hu	-----M	NKQDLI	AKVAE	A	TELT	-----K	DSAAA	VD	TVF	SSIE
Spyog_HU	-----M	NKQDLI	AKVAE	A	TELT	-----K	DSAAA	VD	AVF	STIE
Sgall_HlpA	-----M	NKQDLI	AKVAE	A	TELT	-----K	DSAAA	VD	AVF	SAIES
GBS_Hup	-----M	NKQDLI	AKVAE	A	TELT	-----K	DSAAA	VD	AVF	AAVADY
Spneu_HU	-----M	NKQDLI	AKVAE	A	TELT	-----K	DSAAA	VE	AVF	AAVADY
Sg_HlpA	-----M	NKQDLI	AKVAA	A	TELT	-----K	DSAAA	VD	AVF	AAVTEY
Sm_HU	-----M	NKQDLI	AKVAE	A	TELT	-----K	DSAAA	VD	AVF	SAVSSY
Ef_Hup	-----M	NKAELI	ENVAS	T	GLT	-----K	DTAA	VD	AVF	STIQ
Hi_HupA	-----M	NKTDLID	AIA	AAELN	-----K	QAKA	ALE	ATL	DAIT	ASL
Vc_HupA	-----M	NKTQLID	FIAEK	ADLT	-----K	VQAKA	ALE	ATL	GAVE	GAL
Pa_HupB	-----M	NKSELID	AIA	ASADIP	-----K	AVAG	RAL	DA	VIES	VTG

α-1 Vuelta α-2 T

Tabla 2

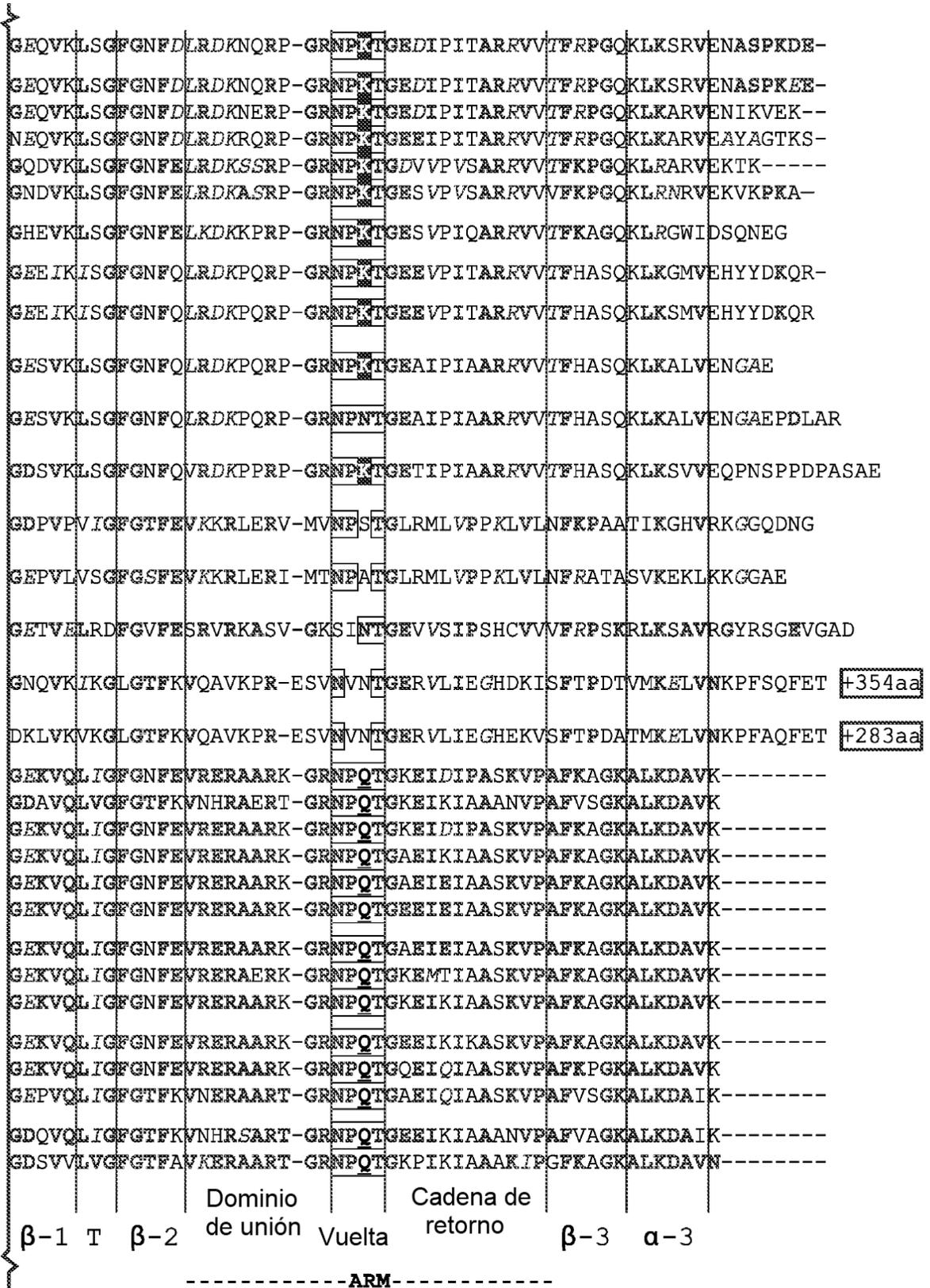


Tabla 2 (continuación)

2	2 (cont.)
---	--------------

SEQ ID NOS 73-76, respectivamente, en orden de aparición

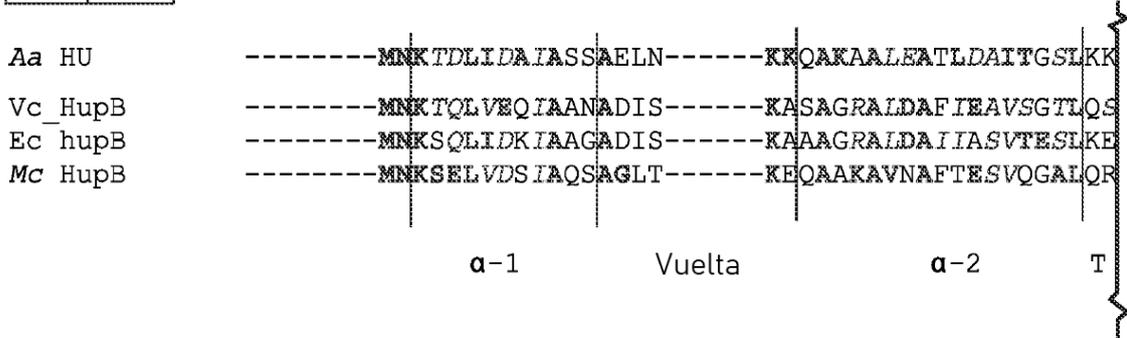


Tabla 2 (continuación)

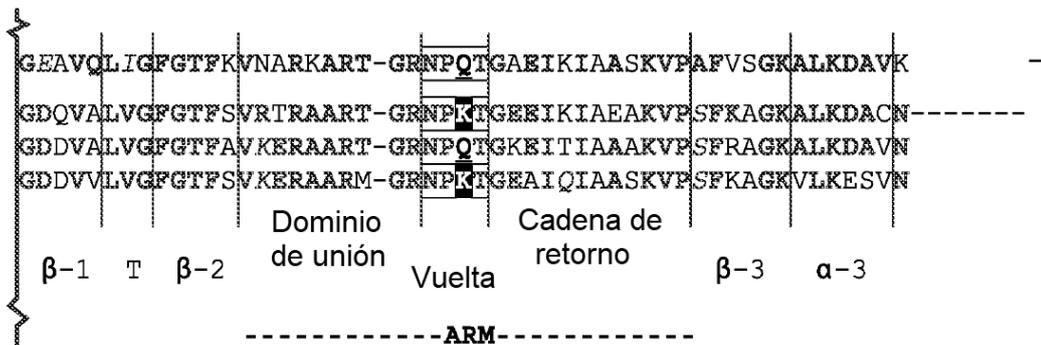


Tabla 2 (continuación)

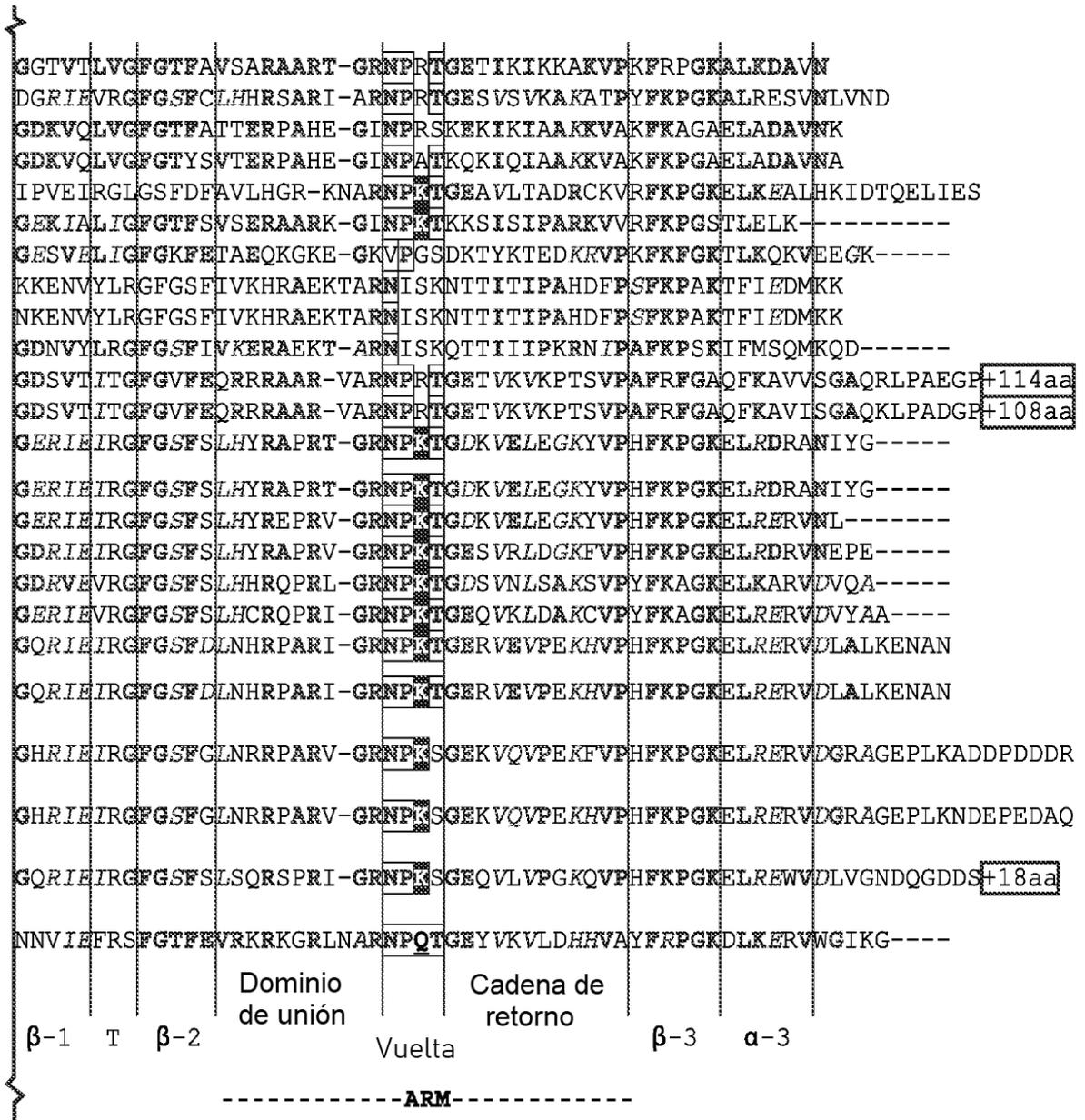


Tabla 2 (continuación)

SEQ ID NOS 101-128, respectivamente, en orden de aparición

Comparación con Liu et al 16 motivos de péptido aa

<i>Strep inter</i> HU	EV RERAAARK-GRNP Q TG
<i>Ec</i> HimA	DLRDKNQRP-GRNP K TG
<i>Salm</i> HimA	DLRDKNQRP-GRNP K TG
<i>Vc</i> HimA	DLRDKNERP-GRNP K TG
<i>Pa</i> HimA	DLRDKRQRP-GRNP K TG
<i>Hi</i> HimA	E LRDKSSRP-GRNP K TG
<i>Aa</i> IHFalpha	E LRDKASRP-GRNP K TG
<i>Mc</i> HimA	E LKDKKPRP-GRNP K TG
<i>Ng</i> IHFalpha	QLRDKPQRP-GRNP K TG
<i>Nm</i> HimA	QLRDKPQRP-GRNP K TG
<i>Bc</i> IHFA	QLRDKPQRP-GRNP K TG
<i>Bp</i> IHFA	QLRDKPQRP-GRNP N TG
<i>Bpert</i> IhfA	QVRDKPPRP-GRNP K TG
<i>Pm</i> HimA	E VKKRLERV-MV N P S TG
<i>Pi</i> HimA	E VKKRLERI-MT N P A TG
<i>Tp</i> Dbp II	E SRVRKASV-GK S I N TG
<i>Pm</i> Hup	KVQAVKPR-ESV N V N TG
<i>Pi</i> hypo	KVQAVKPR-ESV N V N TG
<i>Sa</i> HU	EV RERAAARK-GRNP Q TG
<i>Ec</i> hupA	KVNHRAERT-GRNP Q TG
<i>Se</i> Hup	EV RERAAARK-GRNP Q TG
<i>Ss</i> Hu	EV RERAAARK-GRNP Q TG
<i>Spyog</i> HU	EV RERAAARK-GRNP Q TG
<i>Sgall</i> HlpA	EV RERAAARK-GRNP Q TG
<i>GBS</i> Hup	EV RERAAARK-GRNP Q TG
<i>Spneu</i> HU	EV RERAAERK-GRNP Q TG
<i>Sg</i> HlpA	EV RERAAARK-GRNP Q TG
<i>Sm</i> HU	EV RERAAARK-GRNP Q TG

Tabla 3

SEQ ID NOS 129-139, respectivamente, en orden de aparición

<i>Ef</i> Hup	EVRERAARK-GRNPQTG
<i>Hi</i> HupA	KVNERAART-GRNPQTG
<i>Vc</i> HupA	KVNHRSAAT-GRNPQTG
<i>Bpert</i> HupB	AVSARAART-GRNPRITG
<i>Pa</i> HupB	AVKERAART-GRNPQTG
<i>Aa</i> HU	SVRTRAART-GRNPKITG
<i>Pm</i> HupB	ATTERPAHE-GINPRSK
<i>Pi</i> Hup	SVTERPAHE-GINPATK
<i>Td</i> HU	FAVLHGR-KNARNEKITG
<i>Pg</i> Hup-1	SVSERAARK-GINPKTK
<i>Hp</i> Hup	ETAEQKGKE-GKVEGSD

Tabla 3 (continuación)

SEQ ID NOS 140-159, respectivamente, en orden de aparición

Comparación con Liu et al 16 motivos de péptido aa

<i>Pm</i> HupA	FIVKHRAEKTARNISKN
<i>Pi</i> Hup-2	FIVKHRAEKTARNISKN
<i>Pg</i> Hup-2	IVKERAECT-ARNISKQ
<i>Mt</i> HU	EQRRAAR-VARNPRITG
<i>Ms</i> Hup	EQRRAAR-VARNPRITG
<i>Ec</i> HimD	SLHYRAPRT-GRNPKITG
<i>Salm</i> HimD	SLHYRAPRT-GRNPKITG
<i>Vc</i> HipB	SLHYREPRV-GRNPKITG
<i>Ec</i> hupB	AVKERAART-GRNPQTG
<i>Mc</i> HupB	SVKERAARM-GRNPKITG
<i>Pa</i> HimD	SLHYRAPRV-GRNPKITG
<i>Hi</i> HimD	SLHHRQPRV-GRNPKITG
<i>Aa</i> IHFB	SLHCRQPRI-GRNPKITG
<i>Ng</i> IHFB	DLNHRPARI-GRNPKITG
<i>Nm</i> HimD	DLNHRPARI-GRNPKITG
<i>Bc</i> IHFB	GLNRRPARV-GRNPKSG
<i>Bp</i> IHFB	GLNRRPARV-GRNPKSG
<i>Bpert</i> IhfB	SLSQRSPRI-GRNPKSG
<i>Mc</i> HimD	CLHRSARI-ARNPRITG
<i>Bb</i> Hbb	EVRKRKGRLNARNPQTG

Tabla 3 (continuación)

TABLA 4 (SEQ ID NOS 160-336, respectivamente, en orden de aparición)

Cepa de bacterias, nombre de la proteína	Secuencia β3	Secuencia α3	C-terminal 20 aa
<i>S. pyogenes</i> MGAS10270, HU	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>S. gallolyticus</i> UCN34 (<i>S. bovis</i>), HlpA	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>S. sobrinus</i> 6715 HU	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>S. agalactiae</i> (Group B Strep) 2603VIR Hup	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>S. pneumoniae</i> R6 HU	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>S. gordonii</i> Challis NCTC7868, HlpA	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>S. mutans</i> UA159, HU	AFKAGK	ALKDAVK	IKASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>Enterococcus faecalis</i> V583, Hup	AFKPGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKPGKALKDAVK
<i>S. aureus</i> MW2, HU	AFKAGK	ALKDAVK	IPASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>S. epidermidis</i> RP62A Hup	AFKAGK	ALKDAVK	IPASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>H. influenzae</i> KW20 RdHupA	AFVSGK	ALKDAIK	IAASKVPAFVSGKALKDAIK
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D11S-1 HU	AFVSGK	ALKDAVK	IAASKVPAFVSGKALKDAVK
<i>V. cholera</i> El Tor N16961, HupA	AFVAGK	ALKDAIK	IAAANVPAFVAGKALKDAIK
<i>E. coli</i> K12-MG1655hupA	AFVSGK	ALKDAVK	IAAANVPAFVSGKALKDAVK
<i>P. aeruginosa</i> HupB	GFKAGK	ALKDAVN	IAAAKIPGFKAGKALKDAVN
<i>E. coli</i> K12-MG1655hupB	SFRAGK	ALKDAVN	IAAAKVP SFRAGKALKDAVN
<i>V. cholera</i> El Tor N16961 HupB	SFKAGK	ALKDACN	IAEAKVPSFKAGKALKDACN
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1 HupB	KFRPGK	ALKDAVN	IKKAKVPKFRPGKALKDAVN

(continuación)

Cepa de bacterias, nombre de la proteína	Secuencia β3	Secuencia α3	C-terminal 20 aa
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845 HupB	KFKAGA	ELADAVNK	AAKKVAKFKAGAEALADAVNK
<i>Prevotella intermedia</i> 17 Hup	KFKPGA	ELADAVNA	AAKKVAKFKPGAEALADAVNA
<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4 HupB	SFKAGK	VLKESVN	IAASKVPSFKAGKVLKESVN
<i>P. gingivalis</i> W83 Hup-1	RFKPGS	TLELK	ISIPARKVVRFKPGSTLELK
<i>H. pylori</i> 2669 Hup	KFKPGK	TLKQKVEEGK	KRVPKFKPGKTLKQKVEEGK
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845 HupA	SFKPAK	TFIEDMCK	PAHDFPSFKPAKTFIEDMCK
<i>Prevotella intermedia</i> 17 Hup-2	SFKPAK	TFIEDMCK	PAHDFPSFKPAKTFIEDMCK
<i>P. gingivalis</i> W83 Hup-2	AFKPSK	IFMSQMKQD	KRNIPAFKPSKIFMSQMKQD
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551 HU	AFRPGA	QFKAVVSGAQLPAEGPAVKRG	AKRPATKAPAKKATARRGRK
<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2 Hup	AFRPGA	QFKAVISGAQLPADGPAVKRG	TKAPAKKAAAKKAPAKKRRR
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845 HimA	NFKPAA	TIKGHVRKGGQDNG	NFKPAATIKGHVRKGGQDNG
<i>Prevotella intermedia</i> 17 HimA	NFRATA	SVKEKLKGGAE	VLNFRATASVKEKLKGGAE
<i>E. coli</i> K12-MG1655HimA	TFRPGQ	KLKSRVENASPKE	TFRPGQKLKSRVENASPKE
<i>Salmonella enteric serovar typhi</i> CT18HimA	TFRPGQ	KLKSRVENASPKEE	TFRPGQKLKSRVENASPKEE
<i>V. cholera</i> EI Tor N1696 HimA	TFRPGQ	KLKARVENIKVEK	VTFRPGQKLKARVENIKVEK
<i>P. aeruginosa</i> HimA	TFRPGQ	KLKARVEAYAGTKS	TFRPGQKLKARVEAYAGTKS
<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424 IHFA	TFHASQ	KLKALVENGAE	RVVTFHASQKLKALVENGAE
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668 IHFA	TFHASQ	KLKALVENGAEPLAR	HASQKLKALVENGAEPLAR

(continuación)

Cepa de bacterias, nombre de la proteína	Secuencia β3	Secuencia α3	C-terminal 20 aa
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1 <i>Ihfa</i>	TFHASQ	KLKSVVEQNPSPDPASAE	QKLKSVVEQNPSPDPASAE
<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090 (Oklahoma) <i>IHFα</i>	TFHASQ	KLKGMVEHYDDKQR	TFHASQKLKGMVEHYDDKQR
<i>N. meningitidis</i> MC58 HimA	TFHASQ	KLKSMVEHYDDKQR	TFHASQKLKSMVEHYDDKQR
<i>H. influenzae</i> KW20 <i>RdHimA</i>	TFKPGQ	KLRARVEKTK	RRVVTFKPGQKLRARVEKTK
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D11S-1 HimA	VFKPGQ	KLRNRVEKVKPKA	VVFKPGQKLRNRVEKVKPKA
<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4 HimA	TFKAGQ	KLRGWDSQNEG	VVTFKAGQKLRGWDSQNEG
<i>Treponema palladium</i> Nichols DNA_binding_protein_II	VFRPSK	RLKSAVRYRSGEVGAD	PSKRLKSAVRYRSGEVGAD
<i>Prevotella melanogenica</i> ATCC 25845 Hup	SFTPDT	VMKELVNKPFQFETWINDGV	MQAGDTMKVPKVELRPEYRK
<i>Prevotella intermedia</i> 17 hypothetical	SFTPDA	TMKELVNKPFQFETWINDGV	SAGDTMKVPKVELRPGYRRTK
<i>E. coli</i> K12-MG1655HimD	HFKPGK	ELDRANIYG	KYVPHFKPGKELDRANIYG
<i>Salmonella enteric serovar typhi</i> CT18 <i>bHimD</i>	HFKPGK	ELDRANIYG	KYVPHFKPGKELDRANIYG
<i>V. cholera</i> El Tor N1696 HipB	HFKPGK	ELRERVNL	EGKYVPHFKPGKELRERVNL
<i>P. aeruginosa</i> HimD	HFKPGK	ELRDRVNEPE	KFVPHFKPGKELRDRVNEPE
<i>H. influenzae</i> KW20 <i>RdHimD</i>	YFKAGK	ELKARVDVQA	KSVPYFKAGKELKARVDVQA
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D11S-1 <i>IHFβ</i>	YFKAGK	ELRERVDVYAA	CVPYFKAGKELRERVDVYAA
<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090 (Oklahoma) <i>IHFβ</i>	HFKPGK	ELRERVDLALKENAN	FKPGKELRERVDLALKENAN
<i>N. meningitidis</i> MC58 HimD	HFKPGK	ELRERVDLALKENAN	FKPGKELRERVDLALKENAN
<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424 <i>IHFβ</i>	HFKPGK	ELRERVDGRAGEPLKADPPDDDR	ERVDGRAGEPLKADPPDDDR

(continuación)

Cepa de bacterias, nombre de la proteína	Secuencia β3	Secuencia α3	C-terminal 20 aa
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668 IHFB	HFKPGK	ELRERVDGRAGEPLKNDEPEDAQ	ERVDGRAGEPLKNDEPEDAQ
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1 IhfB	HFKAGK	ELREWDLVGNDQDDSSNGSS	DSSNGSSDPLQSVMDMHAMH
<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4 HimD	YFKPGK	ALRESVNLVND	ATPYFKPGKALRESVNLVND
<i>B. burgdorferi</i> B31 Hbb	YFRPGK	DLKERVWGKIG	HVAYFRPGKDLKERVWGKIG
<i>Treponema denticola</i> A TCC 35405 HU	RFKPGK	ELKEALHKIDTQELIES	PGKELKELKEALHKIDTQELIES

REIVINDICACIONES

1. Una composición de anticuerpos anti-IHF para (i) su uso en el tratamiento o prevención de la recurrencia de una infección por *Burkholderia* en un paciente con Fibrosis Quística (CF) que lo necesite, (ii) su uso en el tratamiento de una infección o enfermedad causada por *Burkholderia* en un paciente con CF infectado con *Burkholderia*,
- 5 en la que el anticuerpo reconoce específicamente y se une a la secuencia de aminoácidos RPGRNPKTGDVVPVSARRV.
2. La composición de anticuerpos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el anticuerpo anti-IHF se administra al paciente en ausencia de un tratamiento con DNasa.
3. La composición de anticuerpos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, y un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de la *Burkholderia*, opcionalmente *Burkholderia cenocepacia* o *B. multivorans*.
- 10 4. La composición de anticuerpos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el anticuerpo anti-IHF es un anticuerpo IgG, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
5. La composición de anticuerpos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el sujeto es un mamífero, opcionalmente un paciente humano, y/o un paciente pediátrico.
- 15 6. La composición de anticuerpos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el sujeto infectado con *Burkholderia* es un sujeto con fibrosis quística.
7. La composición de anticuerpos para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una etapa de poner en contacto la biopelícula o *Burkholderia* con una cantidad efectiva de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de la *Burkholderia* que produce la biopelícula.
- 20 8. Un péptido aislado que consiste en la secuencia RPGRNPKTGDVVPVSARRV y que comprende opcionalmente además un marcador adyuvante o detectable.
9. Un anticuerpo aislado que reconoce específicamente y se une al péptido aislado de la reivindicación 8 que es opcionalmente un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que opcionalmente comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 10. Una línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 9.
11. Un polinucleótido aislado que codifica un péptido aislado de la reivindicación 8 o el anticuerpo de la reivindicación 9 o 10.

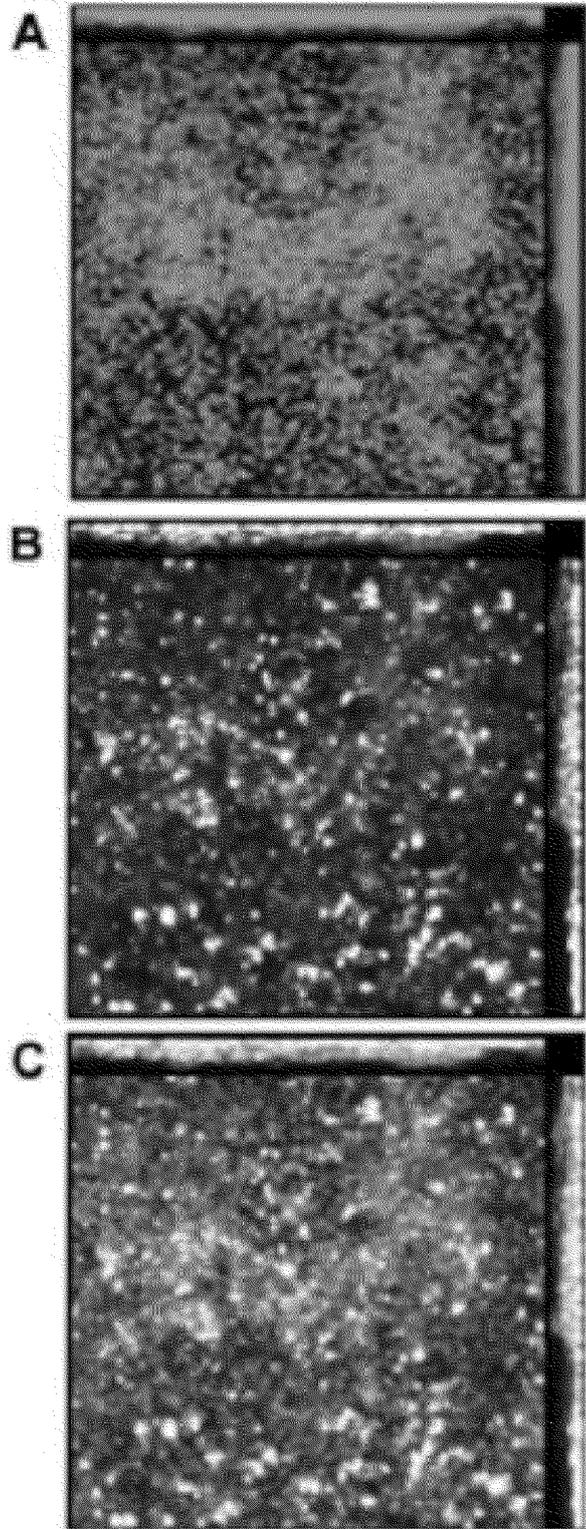


FIG. 1

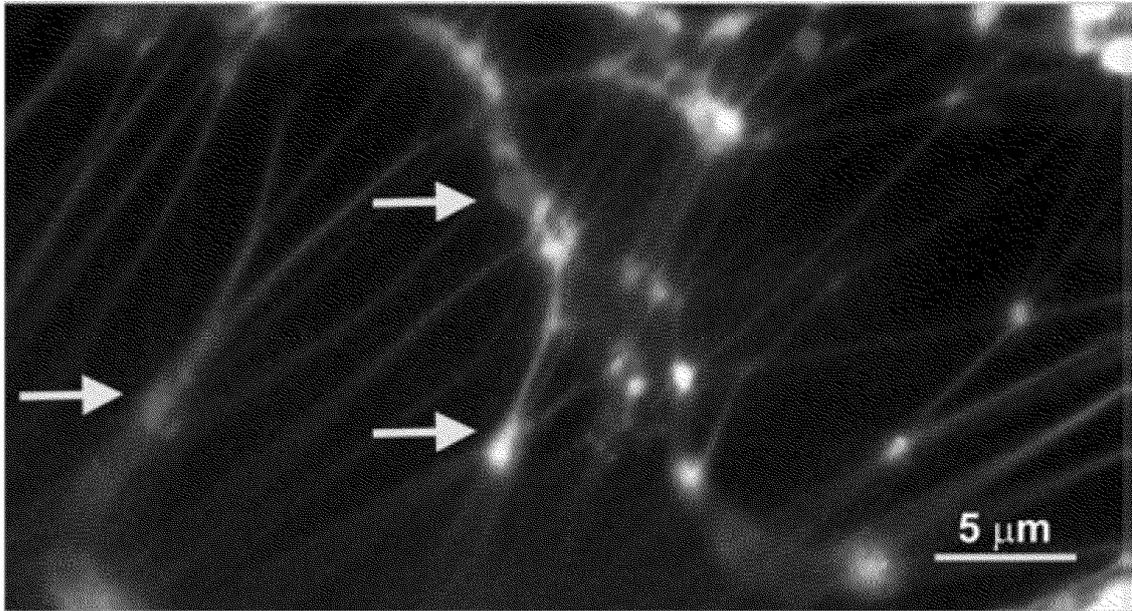


FIG. 2

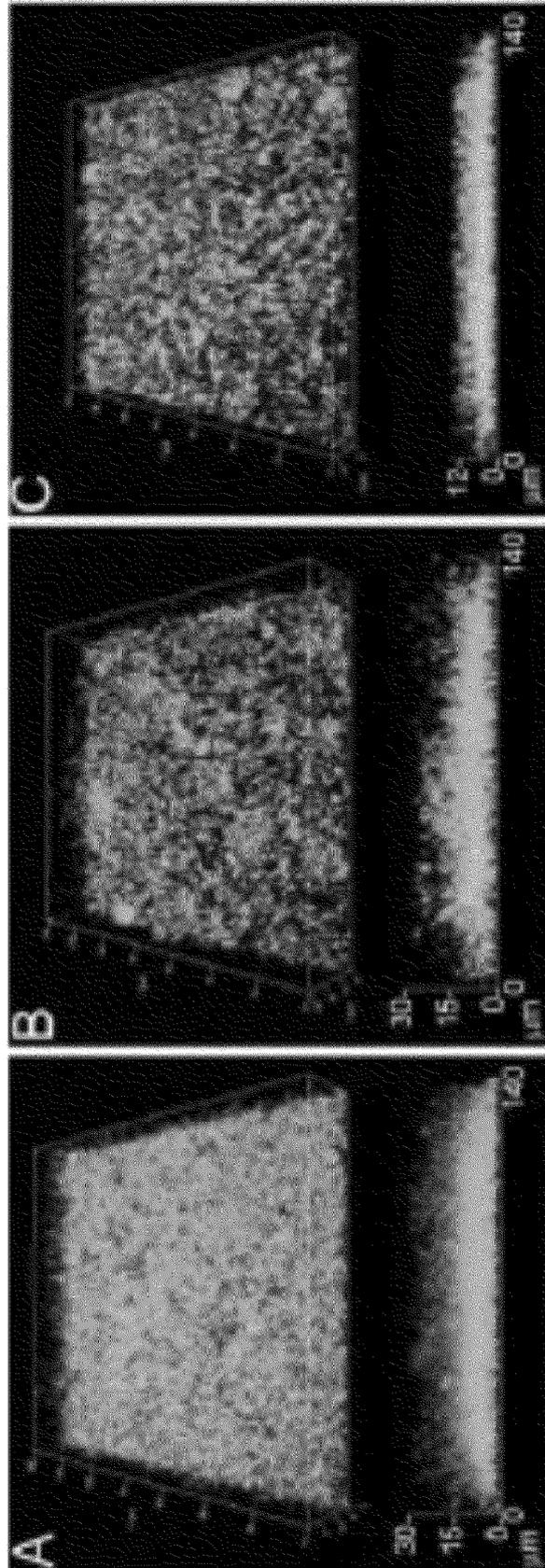


FIG. 3

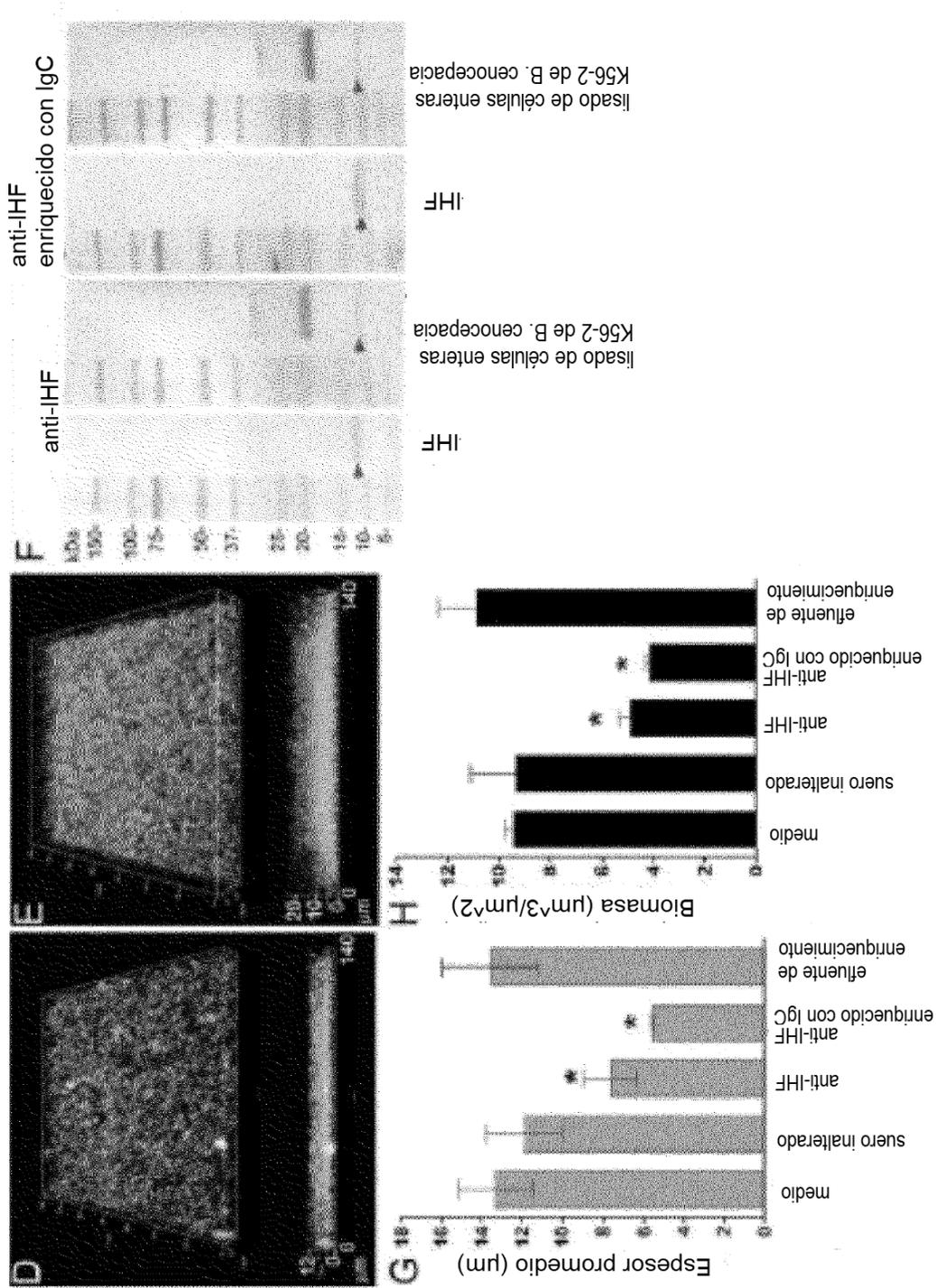


FIG. 3

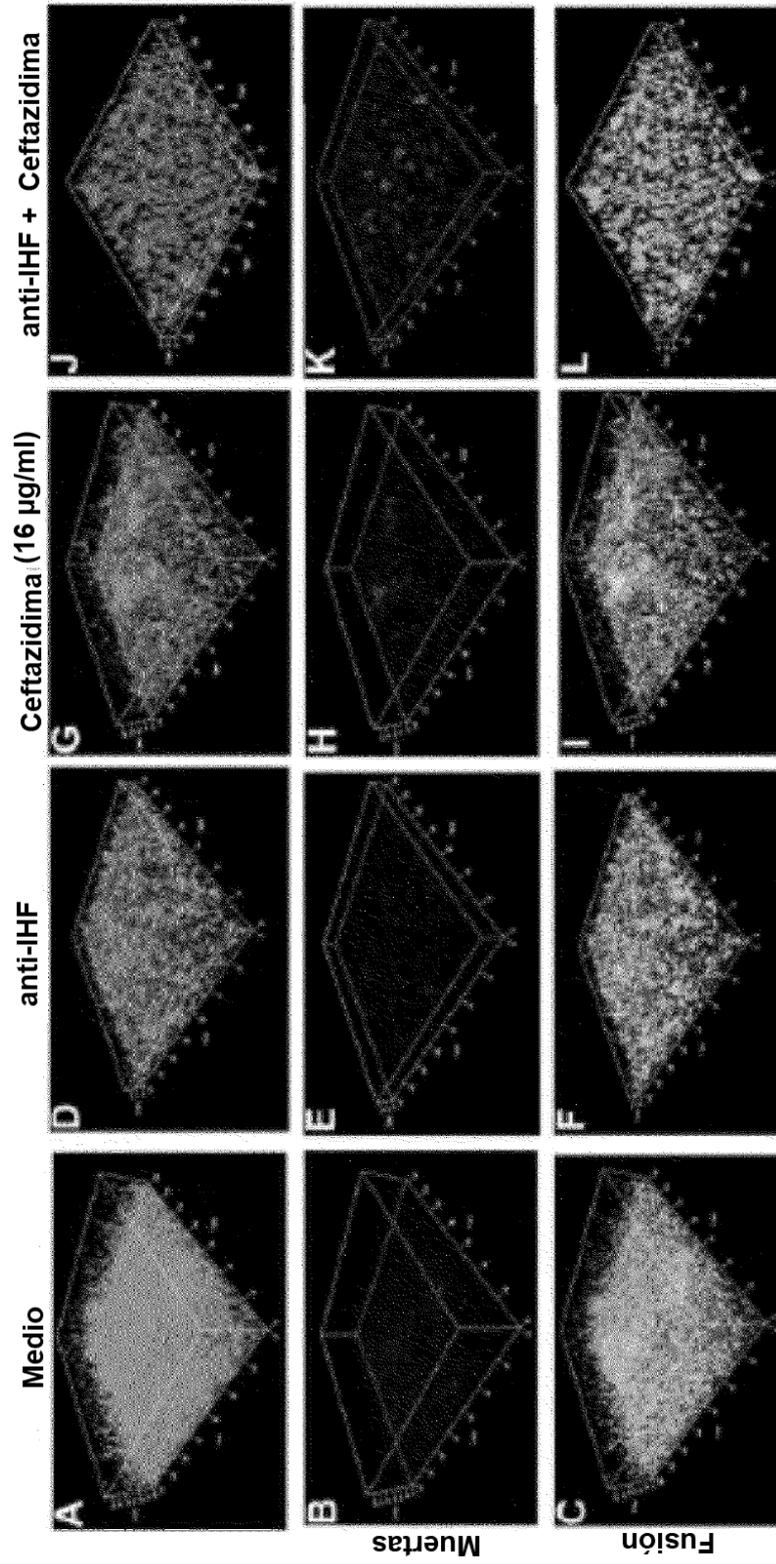


FIG. 4

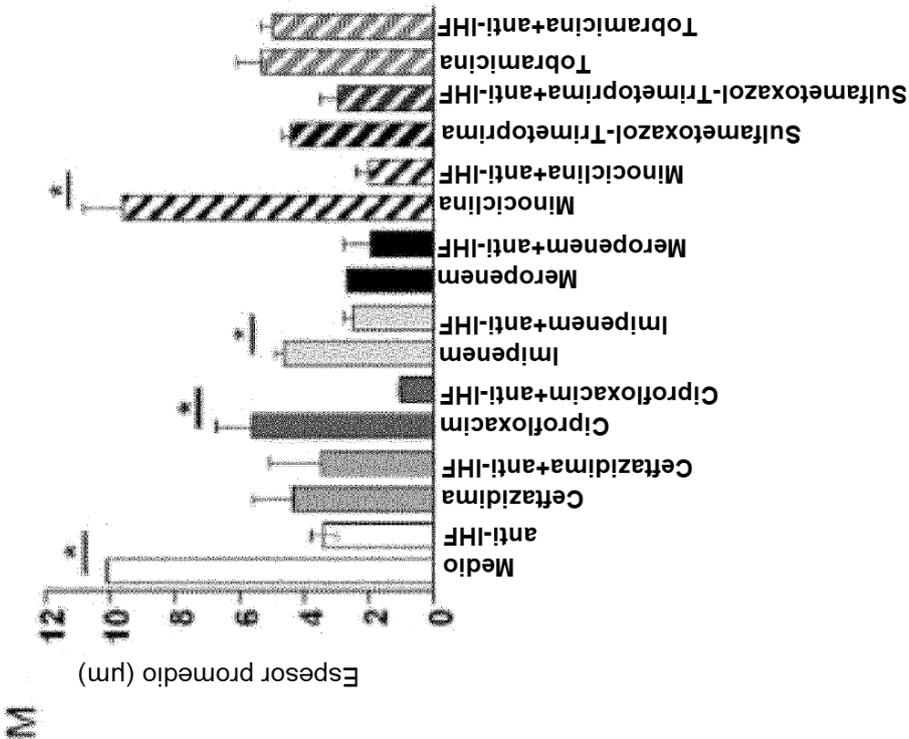
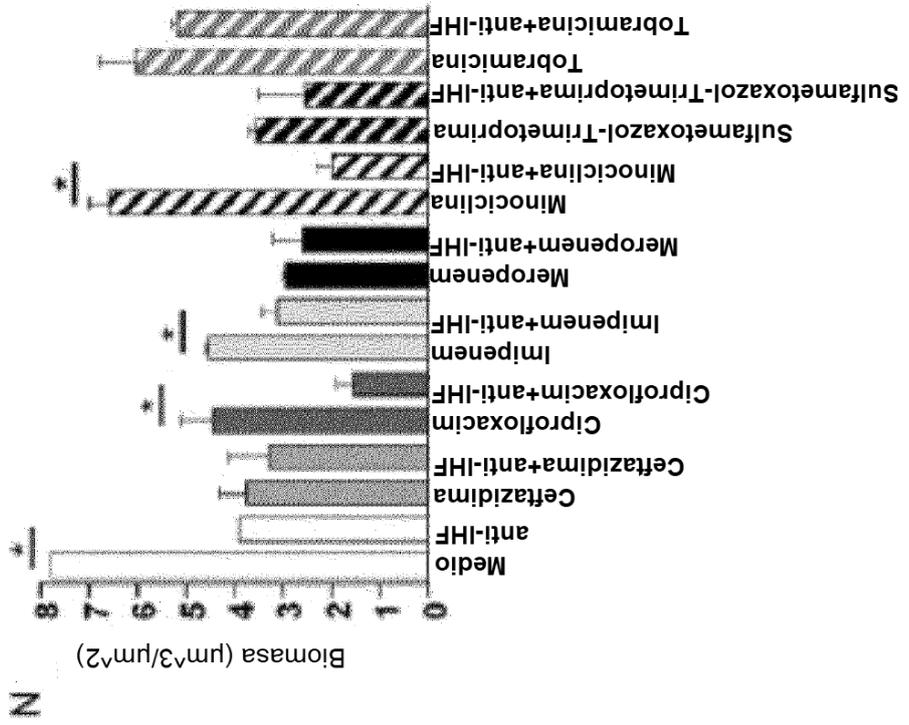


FIG. 4

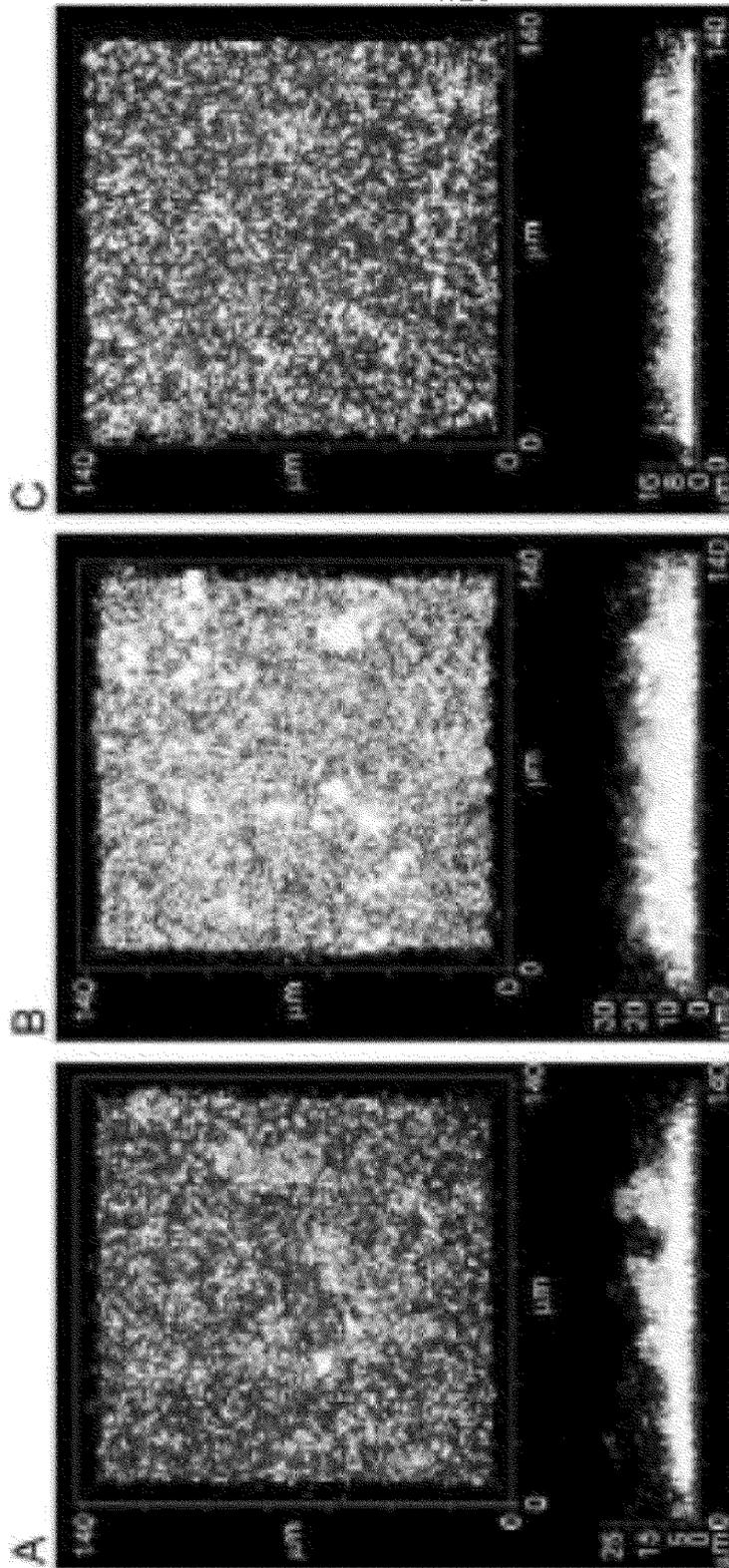
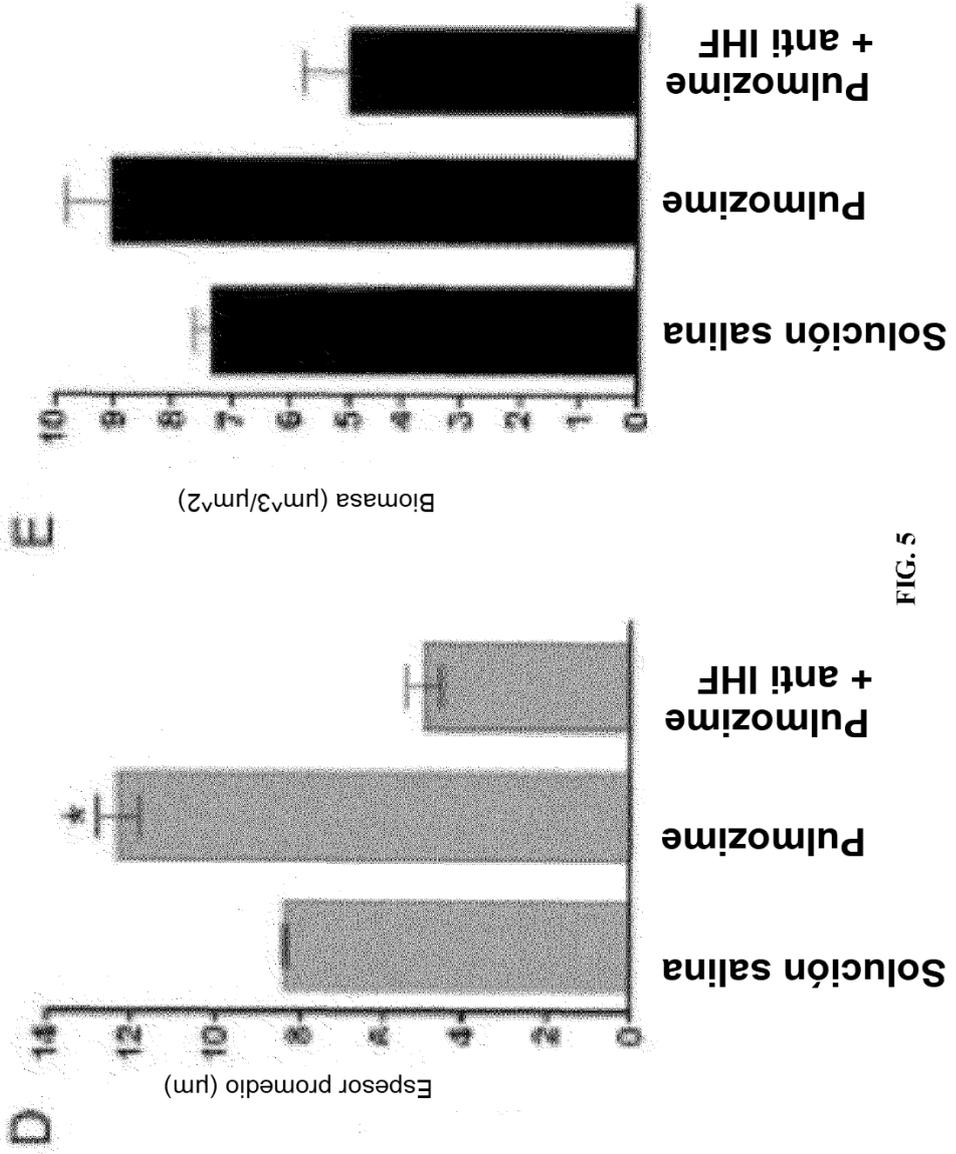
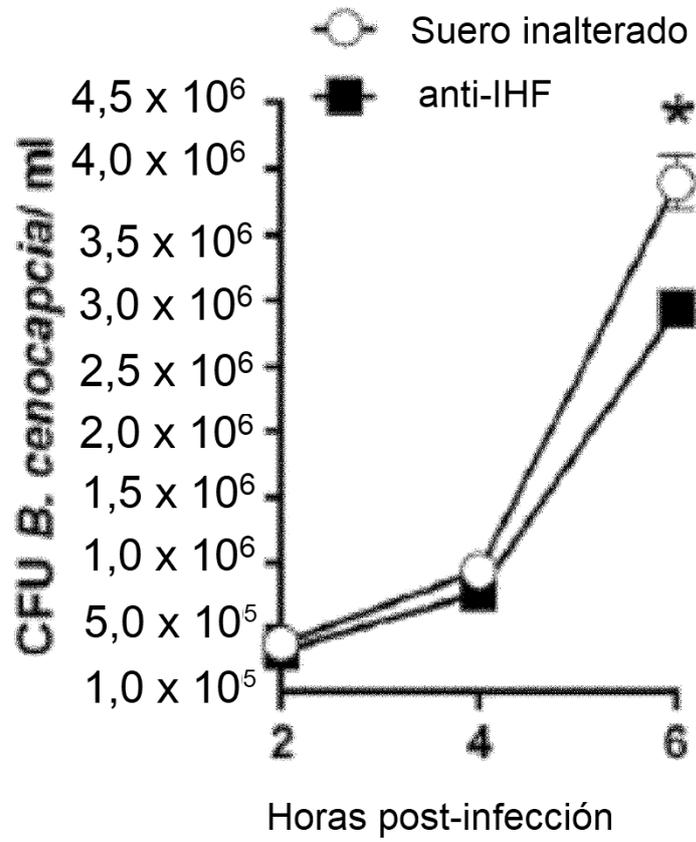


FIG. 5





	2 horas	4 horas	6 horas
Suero de conejo ingenuo	$3,9 \times 10^5 \pm$	$9,4 \times 10^5 \pm$	$3,9 \times 10^6 \pm$
	$4,2 \times 10^3$	$1,8 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$
anti-IHF de conejo	$3,3 \times 10^5 \pm$	$7,7 \times 10^5 \pm$	$2,9 \times 10^6 \pm$
	$2,4 \times 10^4$	$7,1 \times 10^2$	$7,1 \times 10^3$

* p < 0,05

FIG. 6

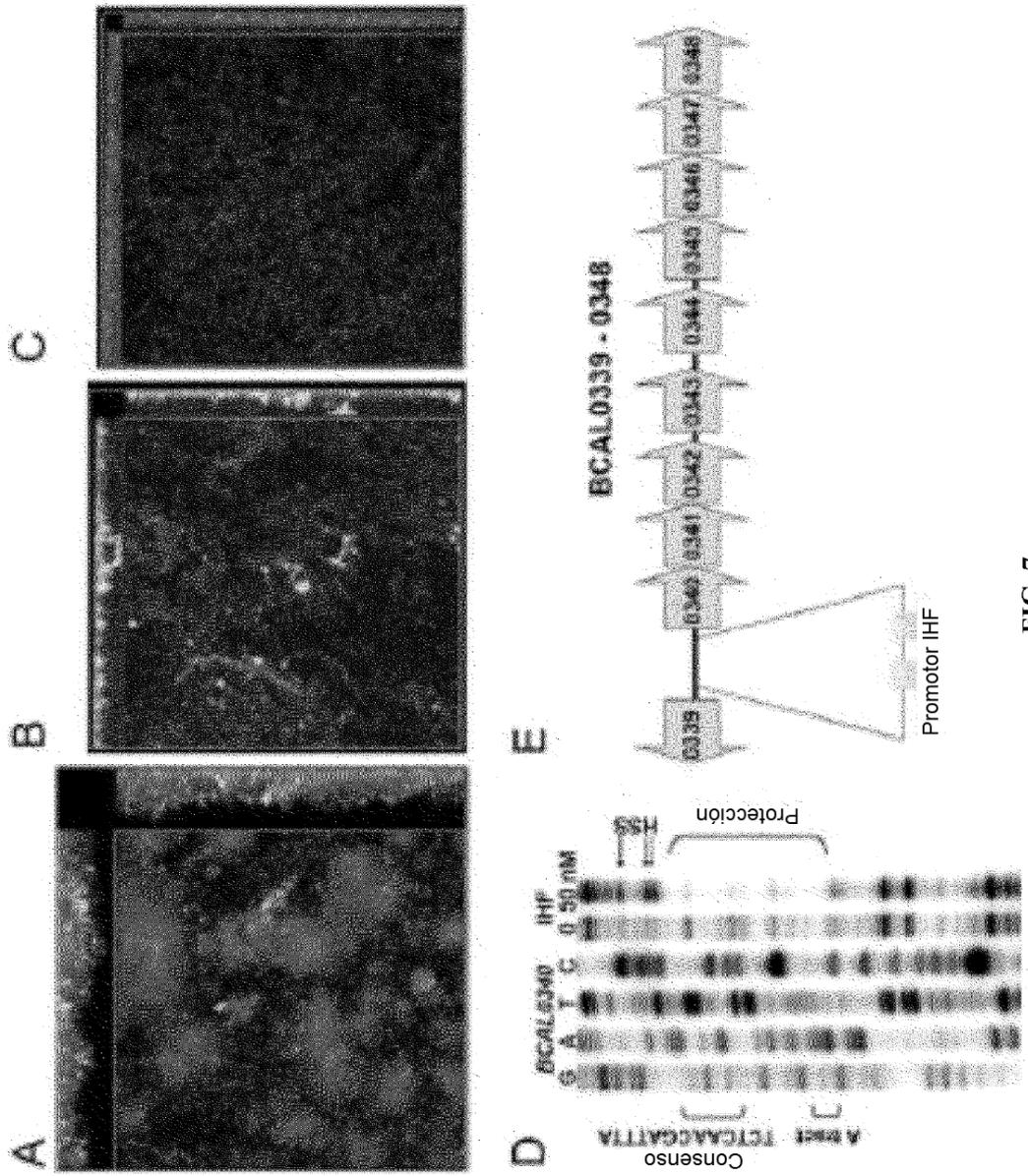


FIG. 7

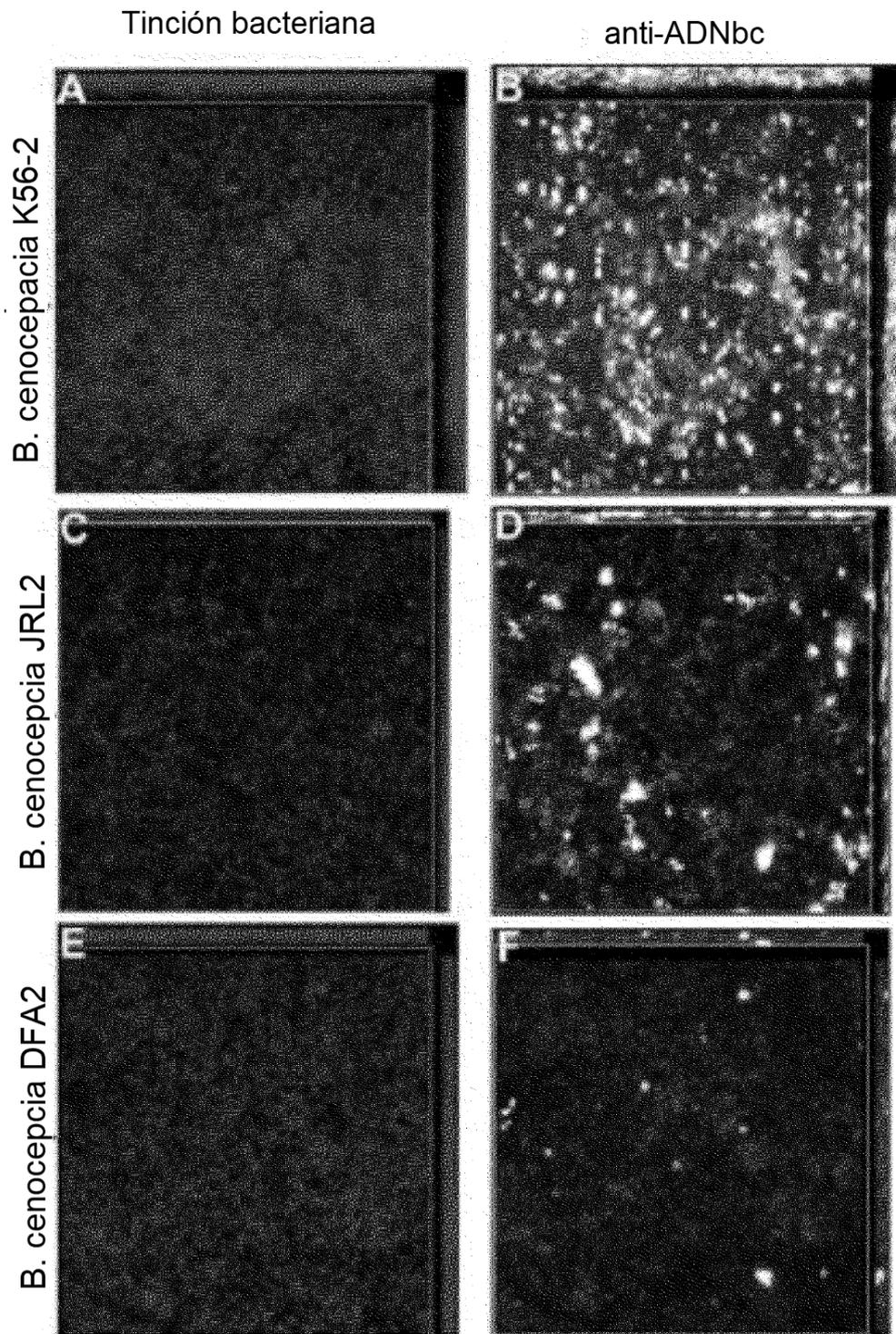
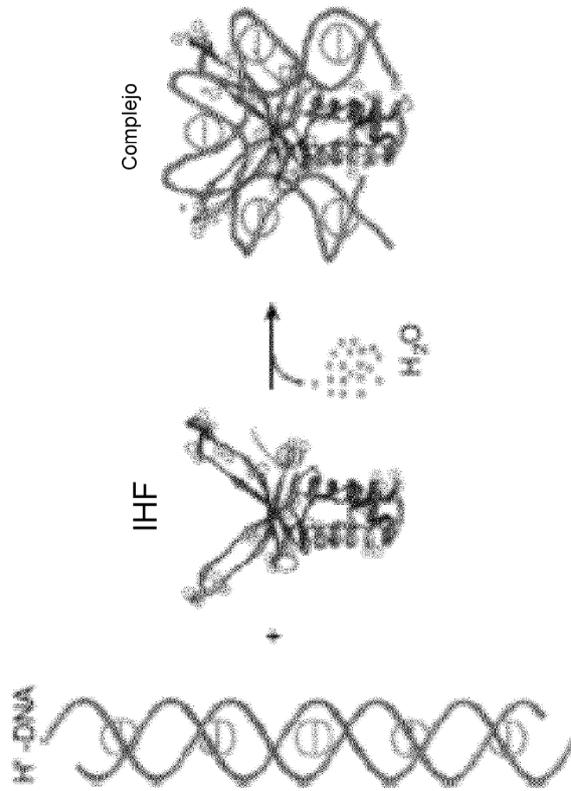
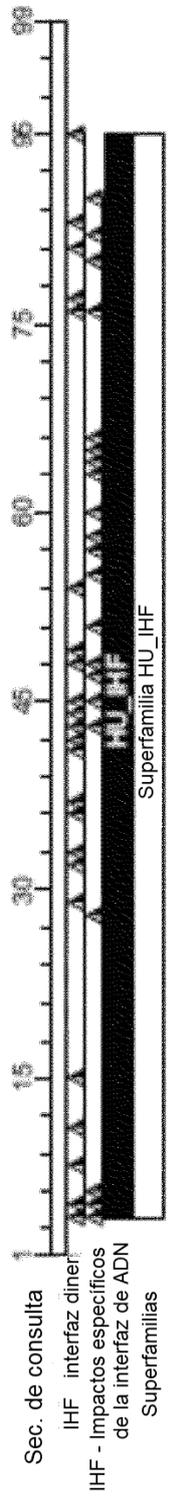


FIG. 8



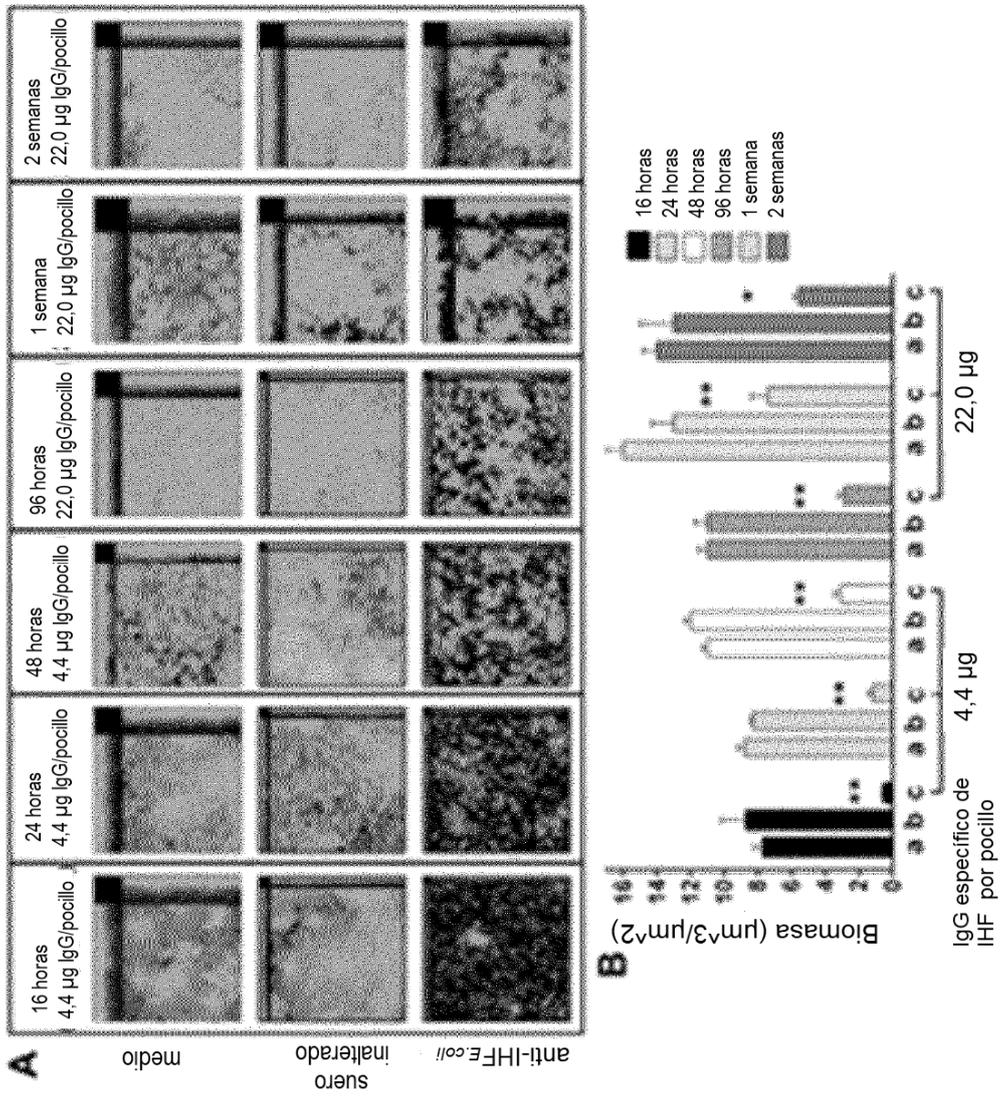
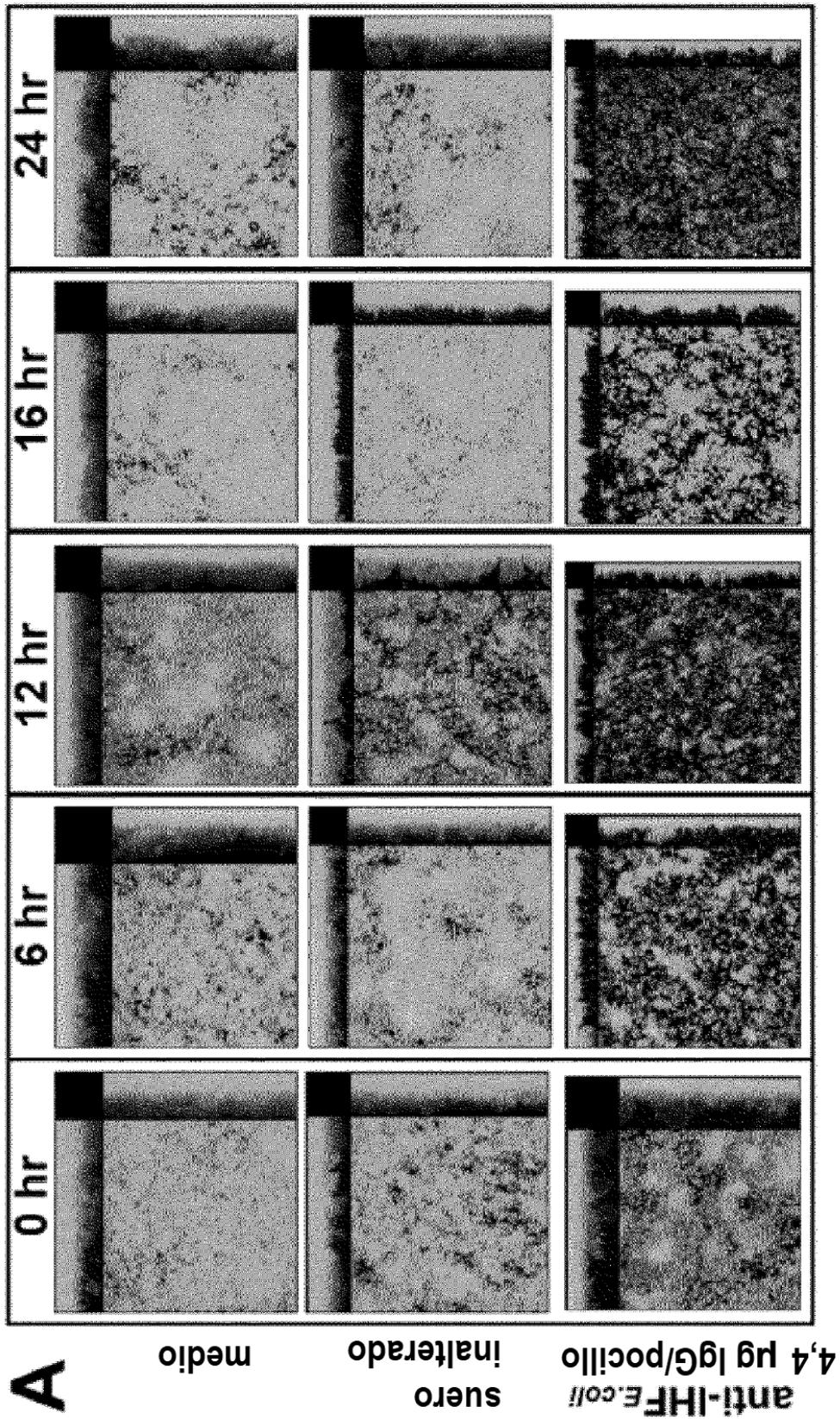


FIG. 10



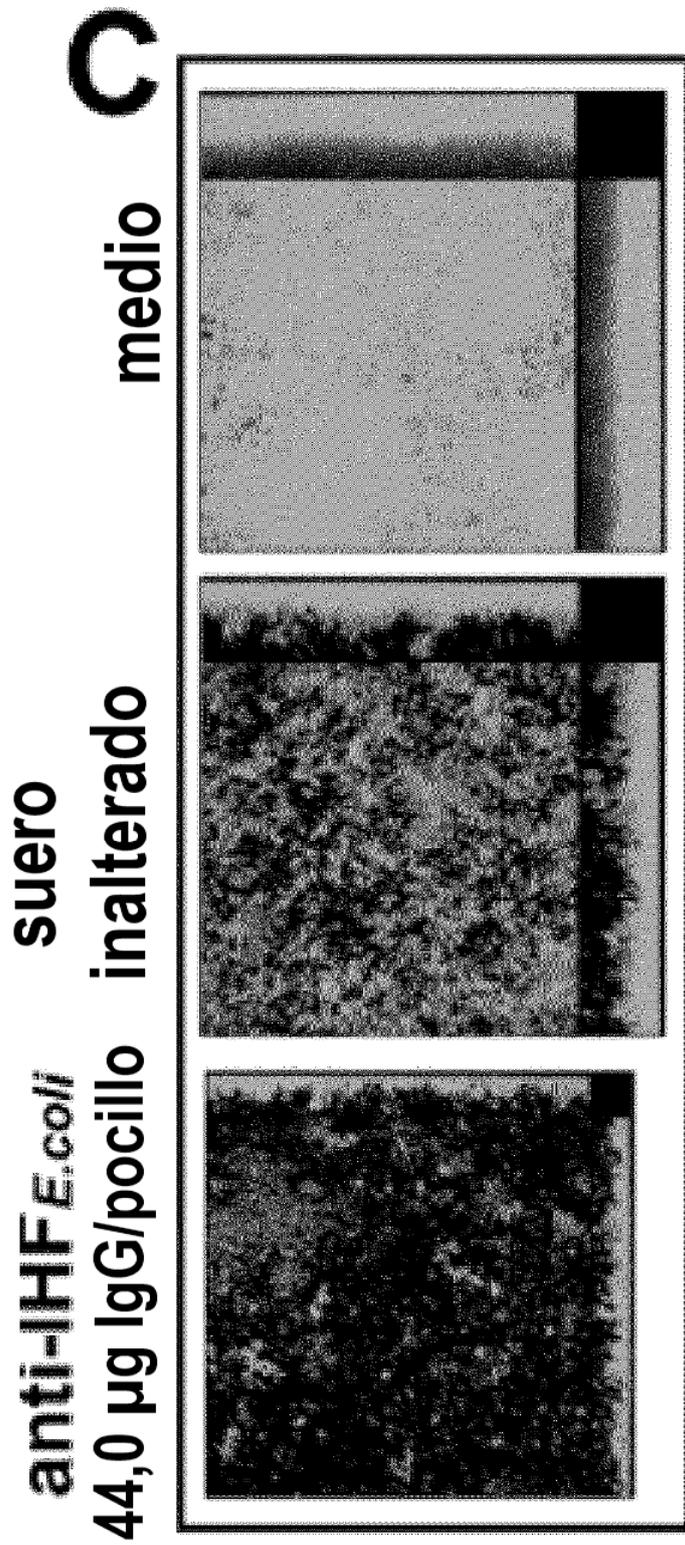


FIG. 11

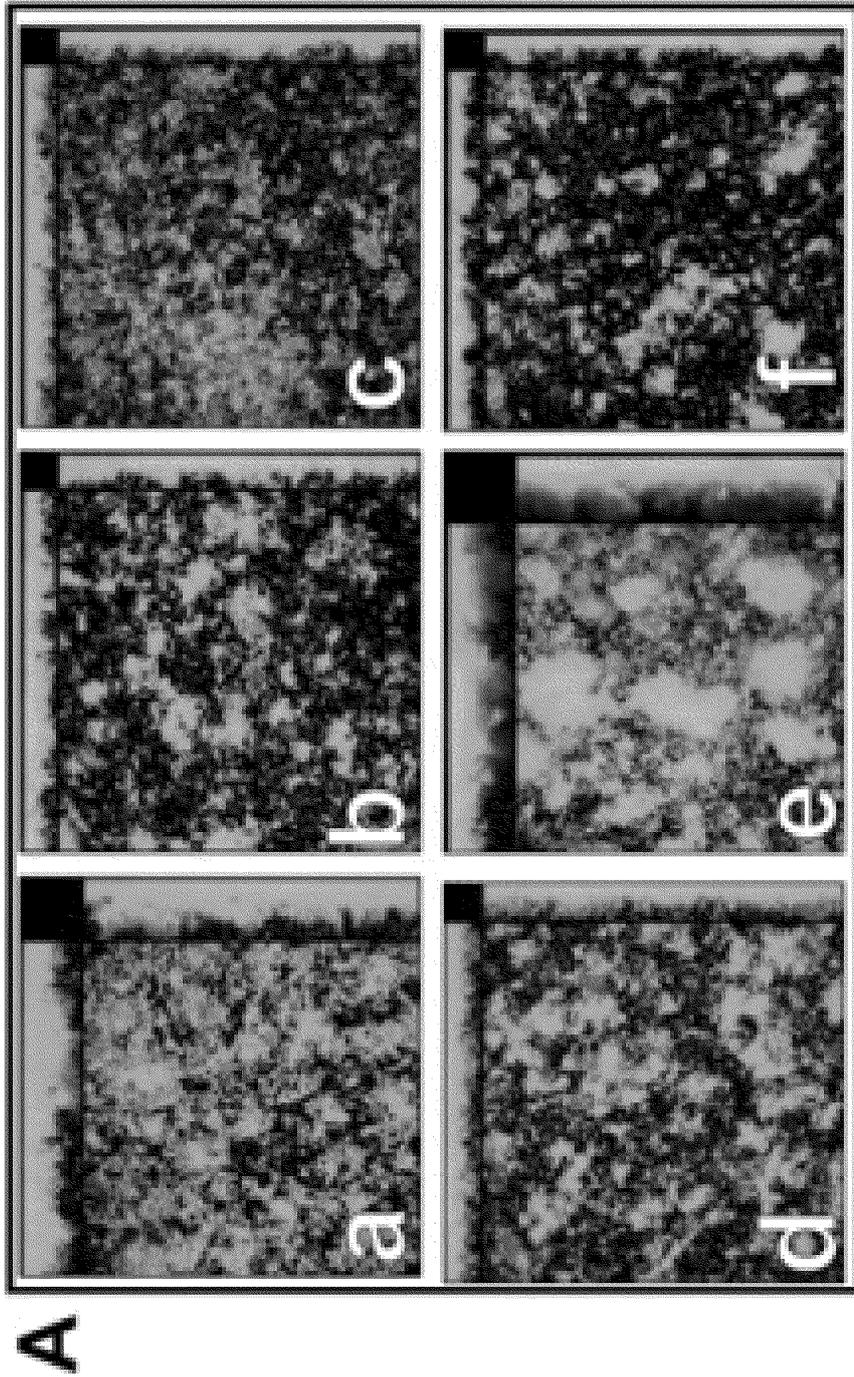


FIG. 13

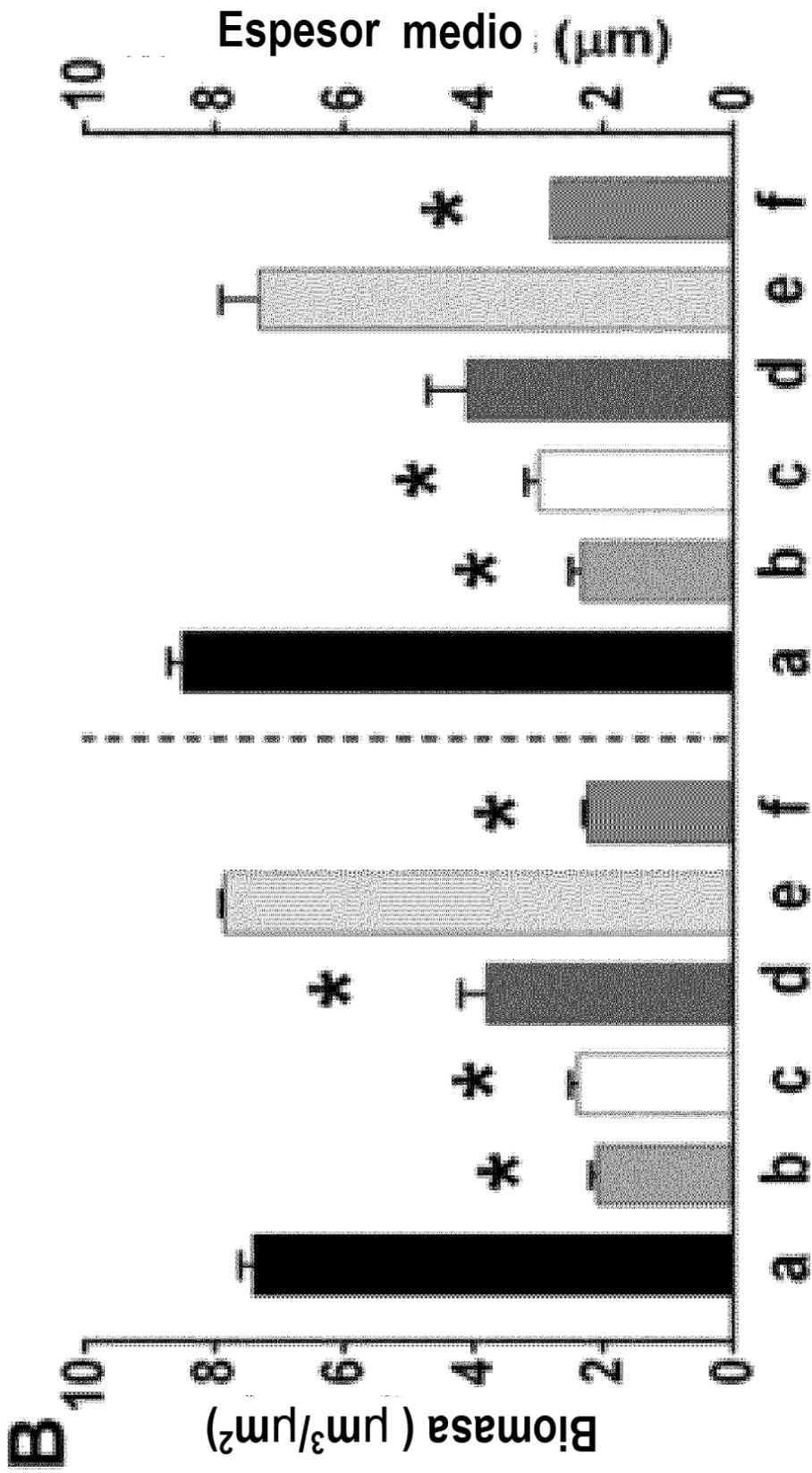


FIG. 13

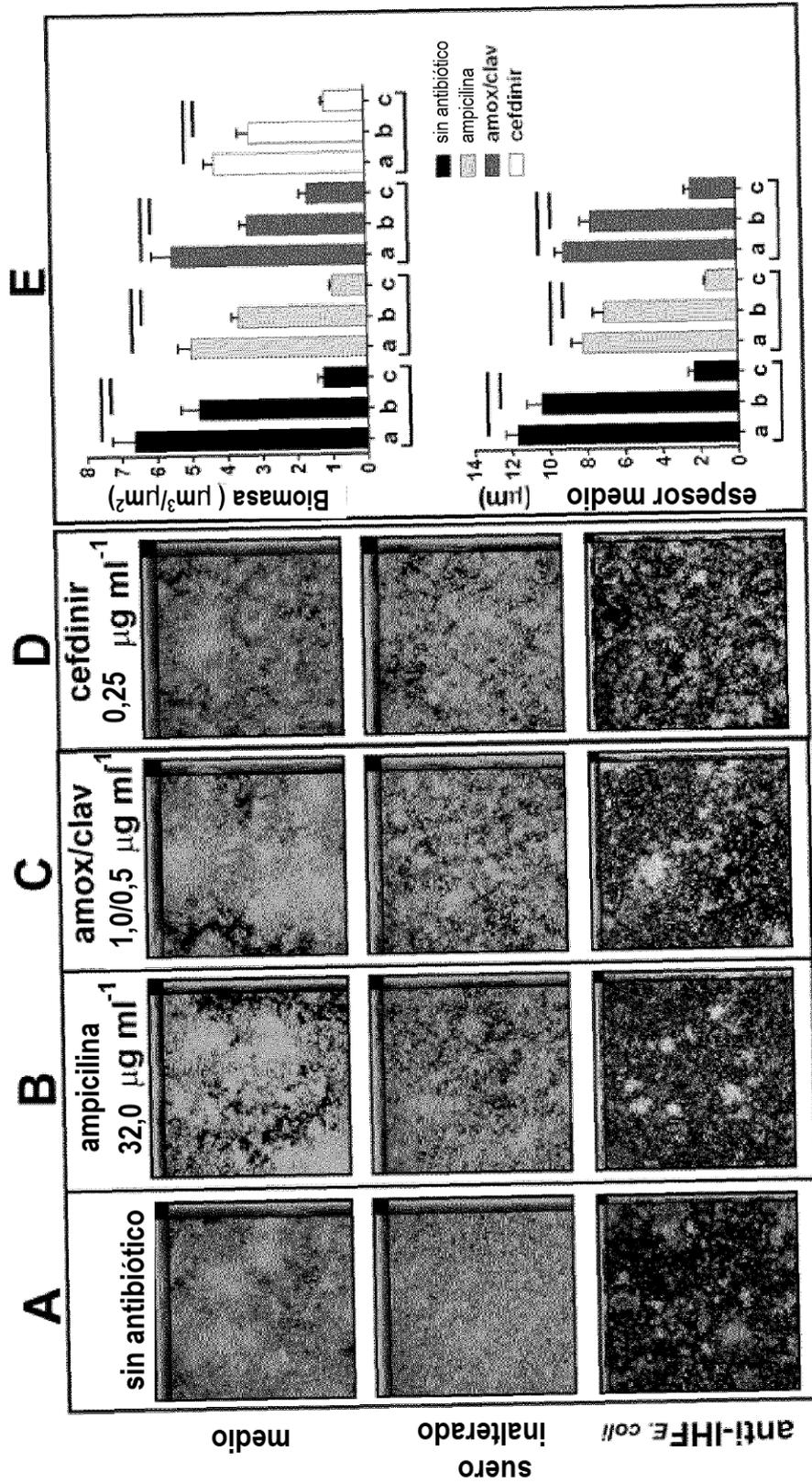


FIG. 14

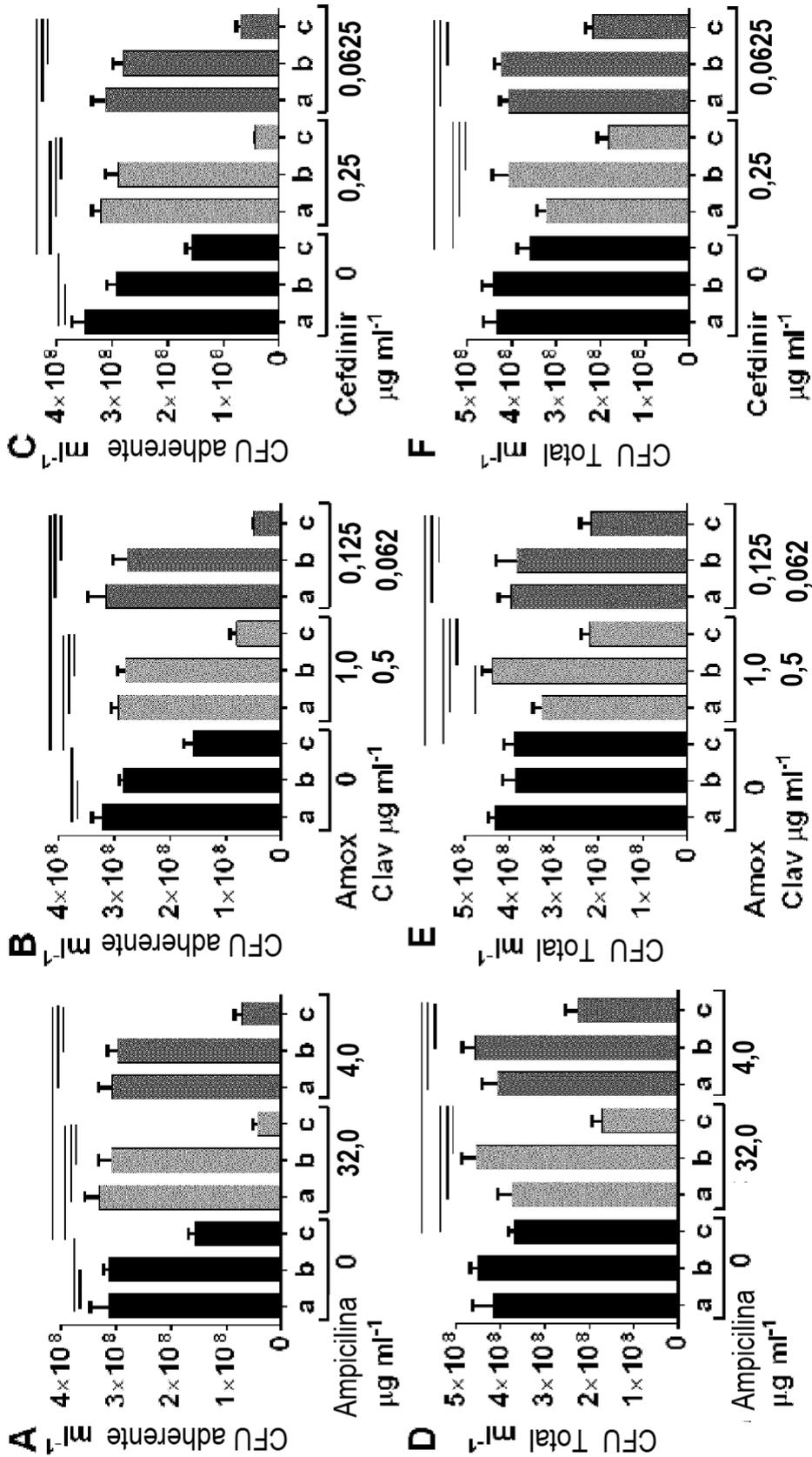


FIG. 15

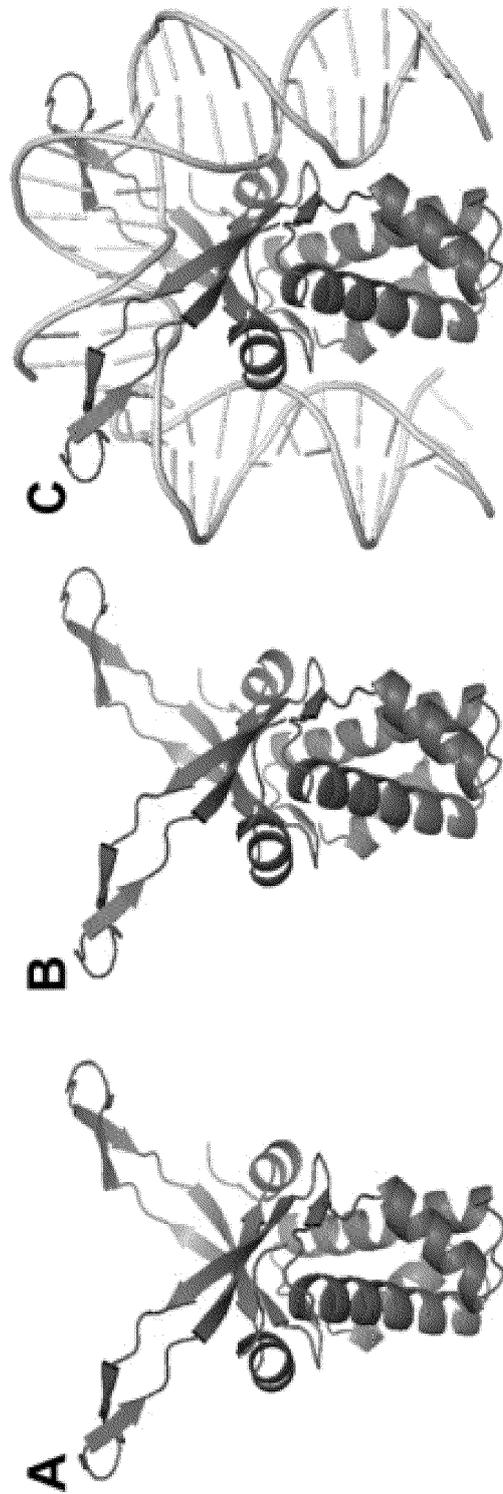


FIG. 16

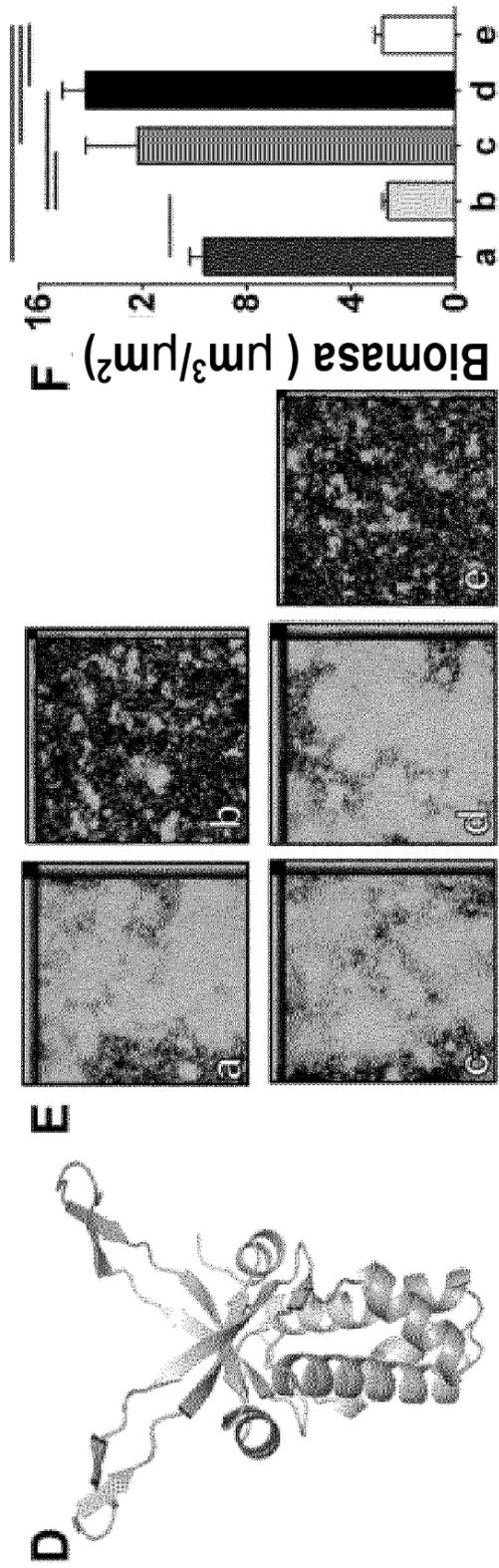


FIG. 16

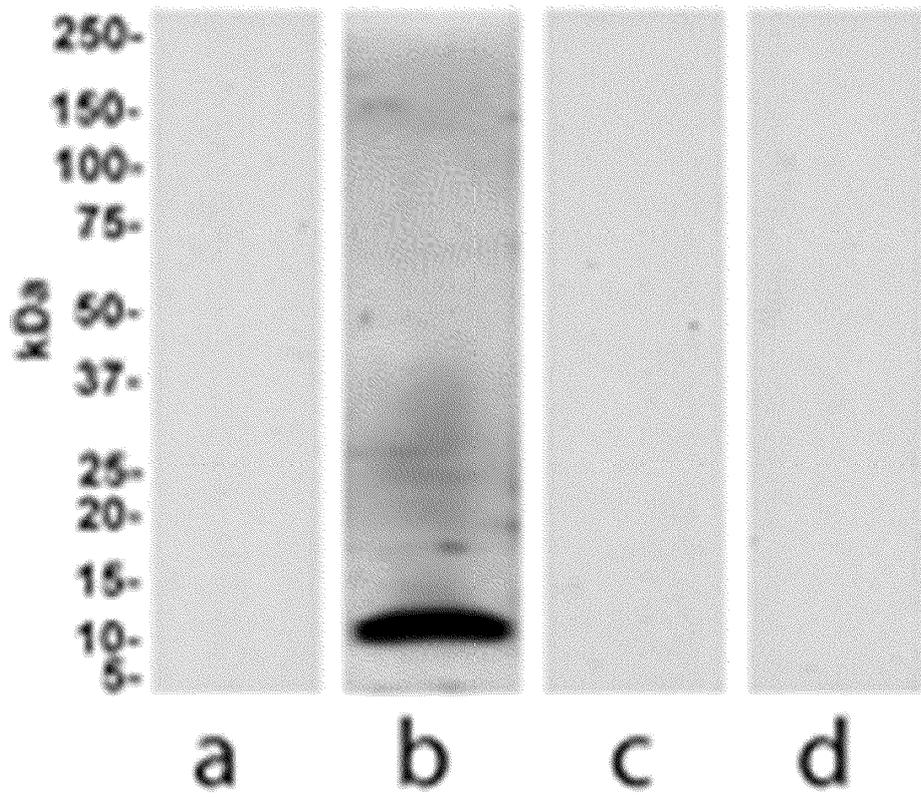


FIG. 17

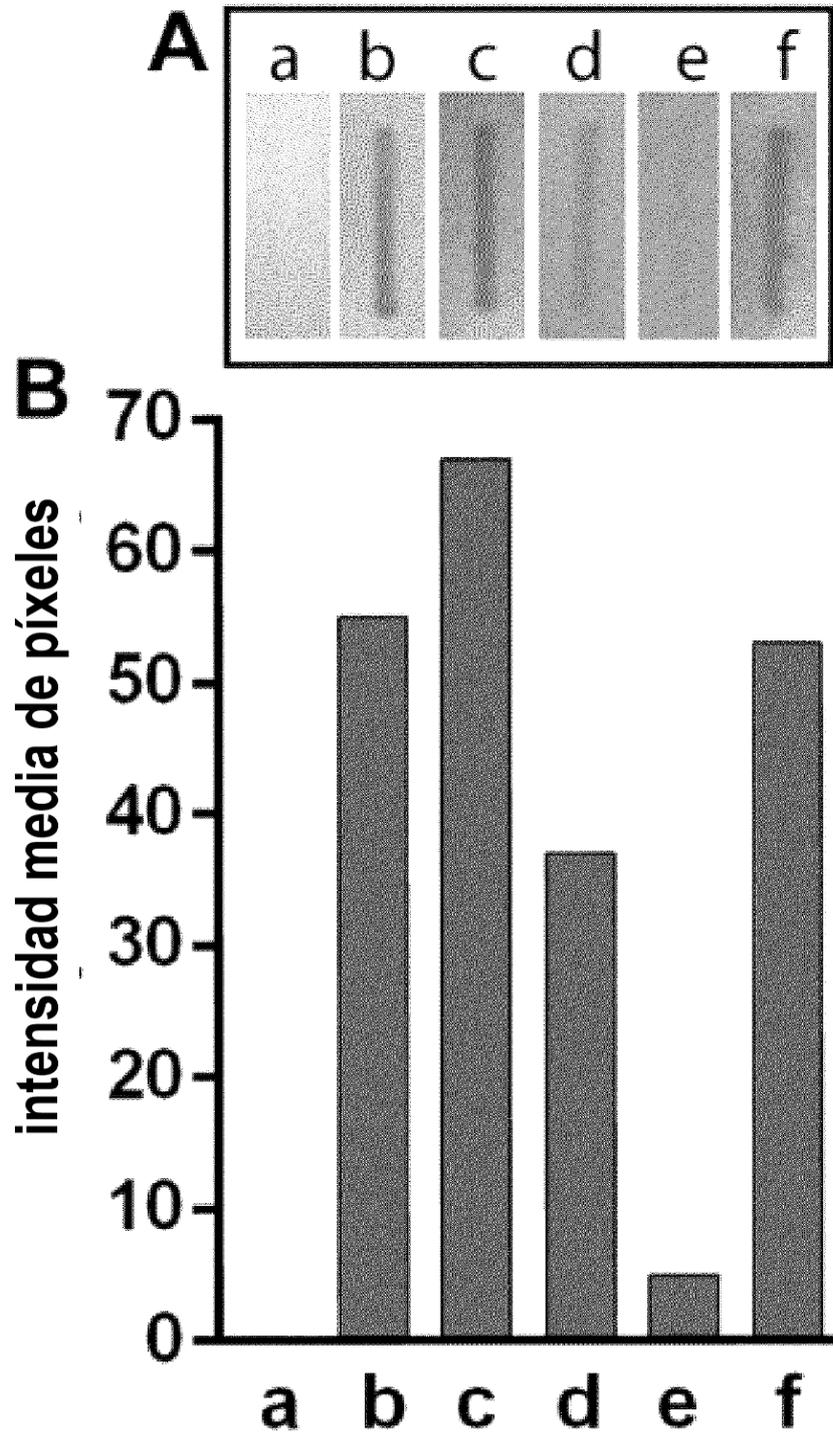


FIG. 18

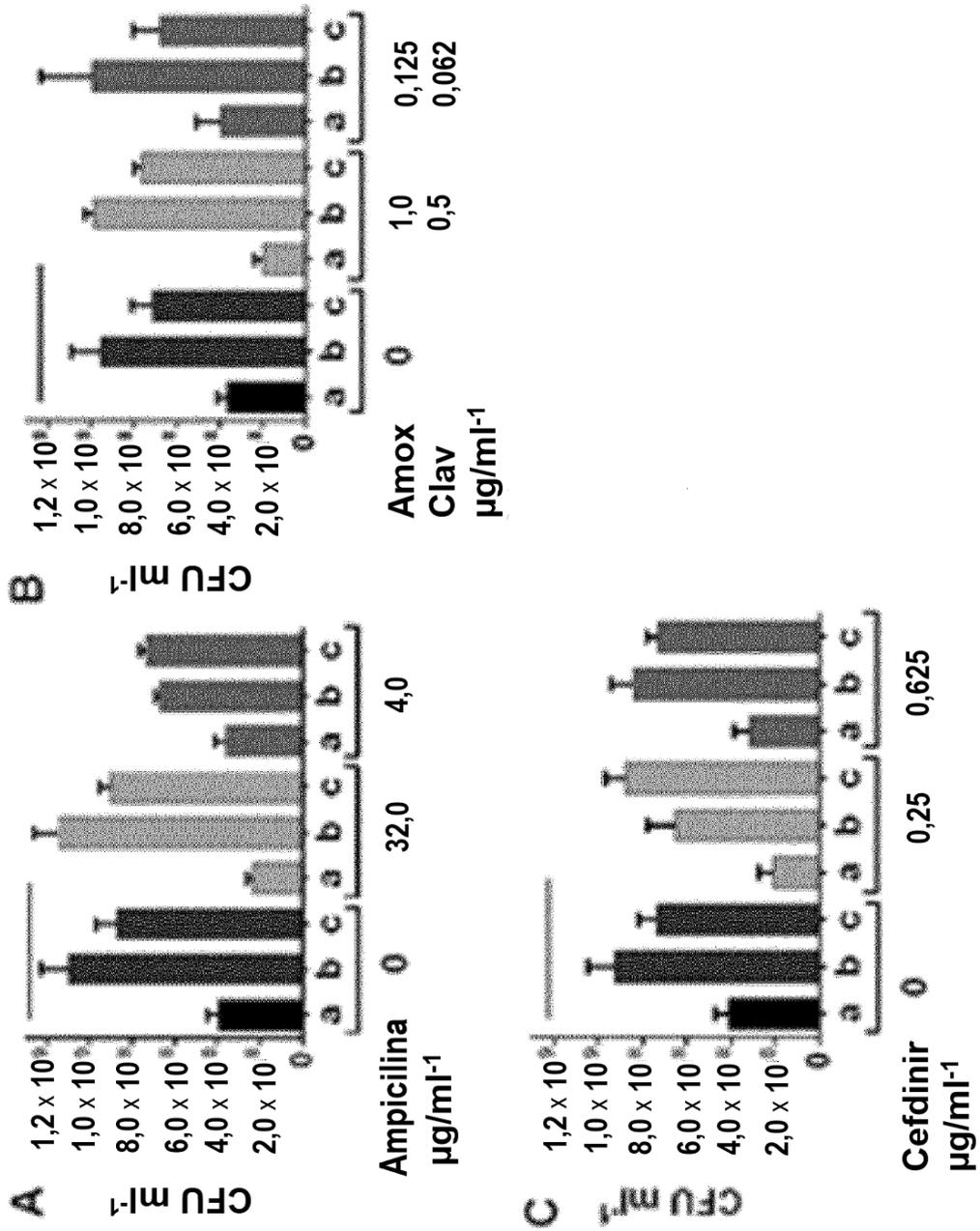


FIG. 19