

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 240**

51 Int. Cl.:

C07K 14/195	(2006.01)	G01N 33/569	(2006.01)
C07K 14/21	(2006.01)	G01N 33/68	(2006.01)
C07K 14/245	(2006.01)		
C07K 14/285	(2006.01)		
C07K 16/12	(2006.01)		
A61K 38/16	(2006.01)		
A61K 39/02	(2006.01)		
A61K 39/102	(2006.01)		
A61K 39/104	(2006.01)		
A61K 39/108	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2011** **PCT/US2011/030212**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011** **WO11123396**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2011** **E 11712739 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019** **EP 2552944**

54 Título: **Composiciones y métodos para la retirada de biopelículas**

30 Prioridad:

21.03.2011 US 454972 P
16.06.2010 US 397891 P
21.05.2010 US 347362 P
29.03.2010 US 318743 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2020

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA
(50.0%)
1150 South Olive Street, Suite 2300
Los Angeles, CA 90015, US y
NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL, INC.
(50.0%)

72 Inventor/es:

GOODMAN, STEVEN D. y
BAKALETZ, LAUREN O.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 754 240 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 métodos para la retirada de biopelículas

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a métodos y composiciones para aliviar y/o curar biopelículas bacterianas clínicas o industriales.

10 ANTECEDENTES

Las bacterias persistentes en una biopelícula en el cuerpo de los mamíferos causan aproximadamente las dos terceras partes de todas las enfermedades crónicas/recurrentes. Estas biopelículas están comprendidas por bacterias protegidas por un "limo" exterior que a menudo está comprendido principalmente por ADN que evita que los sistemas inmunológicos innatos y/o adaptativos, los antibióticos y otros agentes antibacterianos accedan a las bacterias del interior de la biopelícula, haciendo extremadamente difícil eliminar la infección del cuerpo. Además, la biopelícula puede actuar como depósito para infecciones agudas futuras, a menudo con consecuencias letales.

Al menos una proteína de la familia de proteínas DNABII se encuentra en todas las eubacterias conocidas y se encuentran de forma natural en el exterior de la célula bacteriana. Aunque provocan una fuerte respuesta inmunitaria innata, los sujetos hospedadores fracasan al producir de forma natural un anticuerpo específico frente a los miembros de la familia como resultado de la infección. El problema principal con las biopelículas bacterianas es la incapacidad del sistema inmunitario del hospedador y/o de los antibióticos y otros agentes antimicrobianos para obtener acceso a las bacterias protegidas dentro de la biopelícula

Las biopelículas también están presentes en un entorno industrial. Por ejemplo, las biopelículas están implicadas en una amplia diversidad de problemas en el proceso del petróleo, desde el campo de producción al tanque de almacenamiento de las estaciones de servicio. En el campo, las bacterias de biopelículas reductoras de sulfato producen sulfuro de hidrógeno (petróleo acidificado). En las tuberías de proceso, la actividad de la biopelícula desarrolla limos que obstruyen filtros y orificios. La biopelícula y los organismos de la biopelícula también causan la corrosión de la tubería y el equipo de proceso del petróleo. Estos problemas se pueden manifestar en toda la instalación de producción de petróleo o gas hasta el extremo de que se han encontrado organismos de biopelícula obstruidores y corrosivos incluso en las superficies de los tanques de almacenamiento de productos finales.

En el hogar, se han encontrado biopelículas en o sobre cualquier superficie que soporte el crecimiento microbiano, por ejemplo, en desagües, en superficies de preparación de alimentos, en inodoros y en piscinas y *spas*.

Las biopelículas están implicadas en una amplia diversidad de procesos hídricos, tanto domésticos como industriales. Pueden crecer sobre la superficie de equipo de proceso e impedir el rendimiento del equipo, tal como la degradación de la transferencia de calor o la obstrucción de filtros y membranas. Las biopelículas que crecen en el relleno de una torre de refrigeración pueden añadir demasiado peso y causar el colapso del relleno. Las biopelículas causan corrosión de aceros inoxidables incluso altamente especializados. Las biopelículas en un proceso hídrico pueden degradar el valor de un producto final tal como la contaminación por biopelícula en un proceso de papel o la unión de incluso una sola célula en un chip de silicio. Las biopelículas que crecen en los sistemas de distribución de agua potable pueden albergar organismos patógenos potenciales, organismos corrosivos o bacterias que degradan la calidad estética del agua.

De ese modo, existe la necesidad de atravesar la barrera protectora de las biopelículas para tratar o exterminar las infecciones bacterianas asociadas y eliminarlas de las superficies y de los sistemas hídricos. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

Hall-Stoodley *et al.* (2009) "Evolving concepts in biofilm infections", Cellular Microbiology 11 (7):1034-1043 revisan la implicación de la formación de biopelículas en infecciones microbianas y discute métodos para tratar tales infecciones que fijan como objetivo la formación de la biopelícula.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1

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;

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.

5 SEQ ID NO: 2 es VKKSGFGNF

SEQ ID NO: 3 es B1-B2-B3-B4-B5-B6-B7
en la que:

10 B1 está ausente o es uno cualquiera de G o K;
B2 está ausente o es 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;
B6 es uno cualquiera de T, K o S; y
15 B7 es uno cualquiera de G, K, Q o D.

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

20 SEQ ID NO: 5 GRNP(K/Q)TG

SEQ ID NO: 6 lhfa de *Haemophilus influenzae* 86-028NP de tipo natural (wt) de longitud completa; n.º de acceso a Genbank: AAX88425.1, último acceso el 21 de marzo de 2011:

MATITKLDIIEYLSDKYHLSK

QDTKNVVENFLEEIRLSLESGQDVKLSGFGNFELRDKSSRPGRNPKTGDVVPVSARR

VVTFKPGQKLRARVEKTK

25 SEQ ID NO: 7 HU de *Haemophilus influenzae* 86-028NP wt de longitud completa, n.º de acceso a Genbank: YP_248142.1, último acceso el 21 de marzo de 2011: MRFVTIFINHA FNSSQVRLSFAQFLR
QIRKDTFKESNLFNRRYKFMNKTDLIDAIANA AELNKKQAKAALEATLDAITASLK

EGEPVQLIGFGTFKVNRAARTGRNPQTGA EIQAASKVPAFVSGKALKDAIK

30 SEQ ID NO: 8 lhfa de *Haemophilus influenzae* R2846 wt de longitud completa, n.º de acceso a Genbank: AD096375, último acceso el 21 de marzo de 2011:

MATITKLDIIEYLSDKYHLSKQDTKNVVENFL

EEIRLSLESGQDVKLSGFGNFELRDKSSRPGRNPKTGDVVPVSARRVVTFKPGQKLR

ARVEKTK

SEQ ID NO: 9: lhfa de *Haemophilus influenzae* Rd wt de longitud completa; n.º de acceso a Genbank: AAC22959.1, último acceso el 21 de marzo de 2011: MATITKLDIIEYLSDKYHLSKQDTK
NVVENFLEEIRLSLESGQDVKLSGFGNFELRDKSSRPGRNPKTGDVVPVSARRVVTF

35 KPGQKLRARVEKTK;

SEQ ID NO: 10: lhfa de *E. coli* K12 wt de longitud completa; n.º de acceso a Genbank: AAC74782.1, último acceso el 21 de marzo de 2011: MALTKAEMSEYLFDKLGLSKRDAKELVELFFE

EIRRALENGEQVKLSGFGNFDFLRDKNQRPGRNPKTGEDIPITARRVVT

40 FRPGQKLKSRVENASPKDE; n.º Genbank de ADN NC_000913

SEQ ID NO: 11: lhfa de *P. aeruginosa* PA 01 wt de longitud completa; n.º de acceso a Genbank: AAG06126.1, último acceso el 21 de marzo de 2011: MGALTKAEIAERLYEELGLNKREA

KELVELFFEEIRQALEHNEQVKLSGFGNFDFLRDKNQRPGRNPKTGEEIPITARRVVTF

RPGQKLKARVEAYAGTKS

45 SEQ ID NOS: 12 y 13: partes β -3 y α -3 de (IHF α) SEQ ID NO: 12: TFRPGQ y SEQ ID NO: 13: KLKSRVENASPKDE

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

50 SEQ ID NOS: 16 y 17: partes β -3 y α -3 de la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 16: TFKPGQ y SEQ ID NO: 17: KLRARVEKTK

SEQ ID NOS: 18 y 19: partes β -3 y α -3 de lhfa de *Haemophilus influenzae* 2019, SEQ ID NO: 18: TFKPGQ y SEQ ID NO: 19: KLRARVENTK

55 SEQ. ID NOS. 20 y 21: partes β -3 y α -3 de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 20: TFKPGQ y SEQ ID NO: 21:

KLRARVEKTK

SEQ. ID NOS. 22 y 23: partes β -3 y α -3 de la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 22: TFKPGQ y SEQ ID NO: 23: KLRARVEKTK

SEQ ID NOS: 24 y 25: partes β -3 y α -3 de la SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 24: TFRPGQ y SEQ ID NO: 25: KLKSRVENASPKDE

SEQ. ID NOS. 26 y 27: partes β -3 y α -3 de la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 26: TFRPGQ y SEQ ID NO: 27: KLKARVEAYAGTKS

SEQ. ID NO. 28: hupA de *E. coli*, n.º de acceso a Genbank: AP_003818, último acceso el 21 de marzo de 2011: MNKTQLIDVIAEKAELSKTQAKAALESTLAAITESLKEGDVAVQLVGFGTFK
VNHRAERTGRNPQTGKEIKIAANVPAFVSGKALKDAVK

SEQ ID NO: 29: hupB de *E. coli*, n.º de acceso a Genbank: AP_001090.1, último acceso el 21 de marzo de 2011: MNKSQIDKIAAGADISKAAGRALDAIIASVTESLKEGDDVALVGFG
TFAVKERAARTGRNPQTGKEITIAAAKVPSFRAGKALKDAVN

SEQ ID NOS: 30 y 31: partes β -3 y α -3 de la SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30: AFVSGK y SEQ ID NO: 31: ALKDAVK

SEQ ID NOS: 32 y 33: partes β -3 y α -3 de la 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 : KYVPHFKPGKELRDRANIYG

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: IHFalfa de *E. coli*: GRNPKTGEDIP

SEQ ID NO: 338: IHFbeta de *E. coli*: GRNPKTGDKVEL

SEQ ID NO: 339: HUalfa de *E. coli*: GRNPQTGKEIKI

SEQ ID NO: 340: HUbeta de *E. coli*: GRNPQTGKEITI

DESCRIPCIÓN DE LAS TABLAS

Las Tablas 1-5 son los resultados de un bioensayo *in vitro* de la inversión de la biopelícula en el organismo indicado.

La Tabla 6 es el esquema de puntuación de la cantidad relativa de biomasa en el oído medio en el modelo de chinchilla de otitis media (OM).

La Tabla 7 indica los resultados de un bioensayo *in vitro* de la inversión de la biopelícula tras tratamiento con ADNasa.

La Tabla 8 es un resumen no limitado de las proteínas de unión a ADN producidas por bacterias gram(+) y gram(-) que se pueden usar en los métodos previstos en el presente documento.

La Tabla 9A es una alineación de secuencia de las partes pertinentes de las proteínas de unión a ADN de las diversas realizaciones de la presente divulgación. Las letras en negrita indican las coincidencias con el consenso, la inscripción en color gris claro indica un cambio conservativo de aminoácidos, y las secuencias sombreadas en claro u oscuro se conservan altamente a través de las especies. Las secuencias indefinidas sombreadas en gris en los extremos amino y/o carboxi terminales son aminoácidos indefinidos que no comparten secuencias de consenso. La Tabla 9A se basa en información publicada previamente en Obeto *et al.* (1994) Biochimie 76:901-908. La Tabla 9B es una comparación del motivo peptídico de 16 aminoácidos de Liu *et al.* (2008) Cell Microbiol. 10(1):262-276.

La Tabla 10 es un listado de las partes α , β , y C-terminal de las proteínas DNABII del organismo indicado.

SUMARIO

La invención se define en las reivindicaciones. En las células bacterianas, las proteínas DNABII son proteínas de unión a ADN que doblan necesariamente los sustratos de ADN tras la unión. Del mismo modo, el ADN que está ya en una conformación doblada es un sustrato preferente ya que la energía requerida para el doblado se vuelve innecesaria.

La familia de proteínas DNABII se encuentra en el exterior de las células bacterianas en estado de biopelícula. Los Solicitantes han mostrado que estas proteínas están unidas de hecho al ADN extracelular en uniones ramificadas críticas. En un aspecto, los Solicitantes han mostrado que inmunizado al hospedador con polipéptidos y proteínas que producen anticuerpos específicos, la red basada en ADN se altera lo suficiente para permitir en ese caso que el sistema inmunitario del hospedador elimine la biopelícula.

Los Solicitantes también han demostrado la retirada de biopelículas de *Haemophilus influenza* no tipificables preformadas en el oído medio del hospedador chinchilla mediante diversos modos de inmunización con un miembro de la familia de DNABII (factor de integración del hospedador de *E. coli*, IHF). Este sistema animal de biopelícula en el oído medio de chinchilla ya está bien documentado como excelente modelo para otitis media humana (o infecciones del oído medio).

El método para usar esta tecnología es sencillo. En una realización, los polipéptidos de la presente divulgación se usan para vacunar individuos como medida profiláctica a enfermedad de biopelícula crónica/recurrente o como medida terapéutica para aquellos con infección existente. El sistema inmunitario del individuo generará a continuación anticuerpos de forma natural que prevengan o eliminen estas bacterias del hospedador por interferencia con la construcción y/o el mantenimiento de una biopelícula protectora funcional. Alternativamente, se pueden administrar anticuerpos frente a los polipéptidos para tratar o prevenir la infección. Las bacterias que no pueden formar biopelículas funcionales se eliminan con mayor facilidad por parte del resto del sistema inmunitario del hospedador.

De ese modo, en un aspecto, se proporciona un método para inhibir, competir con, o valorar la unión de un polipéptido o proteína DNABII a un ADN microbiano que comprende, o alternativamente que consiste básicamente en, o aún más que consiste en, poner en contacto el polipéptido o proteína DNABII o el ADN microbiano con un agente interferente, para inhibir, competir con, o valorar de ese modo la unión de la proteína o polipéptido DNABII al ADN microbiano. El contacto se puede llevar a cabo *in vitro* o *in vivo*.

En otro aspecto, se proporciona un método para inhibir, prevenir o descomponer una biopelícula microbiana, que comprende, o alternativamente que consiste básicamente en, o aún más que consiste en, poner en contacto la biopelícula con un agente interferente, para inhibir, prevenir o descomponer de ese modo la biopelícula microbiana. El contacto se puede llevar a cabo *in vitro* o *in vivo*.

En un aspecto adicional, se proporciona un método de inhibición, prevención o descomposición de una biopelícula en un sujeto, que comprende, o alternativamente que consiste básicamente en, o aún más que consiste en, administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente interferente, para inhibir, prevenir o descomponer de ese modo la biopelícula microbiana.

En otro aspecto adicional, se proporciona un método para inhibir, prevenir o tratar una infección microbiana que produce una biopelícula en un sujeto. El método comprende, o alternativamente consiste básicamente en, o aún más que consiste en, administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente interferente, para inhibir, prevenir o tratar de ese modo una infección microbiana que produce la biopelícula en el sujeto.

Para los métodos que se describen en el presente documento, se pretende que cualquier agente que interfiera o impida la unión del ADN microbiano a la proteína o el polipéptido DNABII esté dentro del ámbito de la presente divulgación. Algunos ejemplos no limitantes de agentes interferentes incluyen:

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

(b) una proteína de tipo histona aislada o recombinante de un polipéptido de la cepa U93 de *E. coli* (HU) o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(c) una proteína o un polipéptido aislados o recombinantes identificados en la Tabla 8, la Tabla 9A, la Tabla 9B, la Tabla 10 o un péptido de unión a ADN identificado en la Figura 6, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(d) un polipéptido aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 1 a 35, 37 a 340, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(e) un polipéptido C-terminal aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, 42 a 100, la Tabla 8 o los polipéptidos C-terminales identificados en la Tabla 10 o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(f) un polipéptido o un polinucleótido que compite con un factor de integración del hospedador en la unión a un ADN microbiano;

(g) un polinucleótido de cruce de cuatro vías que se parece a la unión de Holliday, un polinucleótido de cruce de 3 vías que se parece a una horquilla de replicación, un polinucleótido que tiene flexibilidad inherente o un

polinucleótido doblado;

(h) un polinucleótido aislado o recombinante que codifica uno cualquiera de (a) a (f) 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 se hibrida en condiciones rigurosas al polinucleótido, su equivalente o su complemento;

(i) un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que reconoce o se une específicamente a uno cualquiera de (a) a (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 el fragmento de unión a antígeno de (i) o su complemento; o

(k) una molécula pequeña que compite por la unión de una proteína o polipéptido DNABII a un ADN microbiano.

En el presente documento también se proporciona un método para inducir una respuesta inmune en o conferir inmunidad pasiva a un sujeto con necesidad del mismo que comprende, o alternatively consiste básicamente en, o aún más consiste en, administrar al sujeto una cantidad eficaz de uno o más agentes del grupo:

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

(b) una proteína de tipo histona aislada o recombinante de un polipéptido de la cepa U93 de *E. coli* (HU) o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(c) una proteína o un polipéptido aislados o recombinantes identificados en la Tabla 8, la Tabla 9A, la Tabla 9B, la Tabla 10 o un péptido de unión a ADN identificado en la Figura 6, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(d) un polipéptido aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 1 a 35, 37 a 340, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(e) un polipéptido C-terminal aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, 42 a 100, la Tabla 8 o los polipéptidos C-terminales identificados en la Tabla 10 o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(f) un polinucleótido aislado o recombinante que codifica uno cualquiera de (a) a (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 se hibrida en condiciones rigurosas al polinucleótido, su equivalente o su complemento;

(g) un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que reconoce o se une específicamente a uno cualquiera de (a) a (e), o un equivalente o fragmento de cada uno de los mismos;

(h) un polinucleótido aislado o recombinante que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de (g);

(i) una célula presentadora de antígeno pulsada con uno cualquiera de (a) a (e); y

(j) una célula presentadora de antígeno transfectada con uno o más polinucleótidos que codifican uno cualquiera de (a) a (e).

Los sujetos con necesidad de tal respuesta inmune incluyen los que se encuentran en riesgo de o padecen una infección que produce una biopelícula microbiana.

En el presente documento también se proporcionan composiciones para su uso en los métodos anteriores, cuyos ejemplos no limitantes se discuten posteriormente.

En un aspecto, se proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternatively consiste básicamente en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NOS: 1 a 5 o 12 a 27, 30 a 35, 101-340 o un péptido de unión a ADN identificado en la Figura 6 o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos.

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternatively consiste básicamente en, o aún más consiste en, las SEQ ID NOS: 1 o 2, con la condición de que el polipéptido no sea ninguna de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100.

En un aspecto, se proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternatively consiste básicamente en, o aún más consiste en, las SEQ ID NOS: 3, 4 o 5, con la condición de que el polipéptido no sea ninguna de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100.

En un aspecto, se proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternatively consiste básicamente en, o aún más consiste en, las SEQ ID NOS: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30 o 32, con la condición de que el polipéptido no sea ninguna de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100.

En un aspecto, se proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternatively consiste básicamente en, o aún más consiste en, las SEQ ID NOS: 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 31 o 33, con la condición de que el polipéptido no sea ninguna de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100.

En un aspecto, se proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternatively consiste básicamente en, o aún más consiste en, las SEQ ID NOS: 337, 338, 339, o 340, con la condición de que el polipéptido no sea ninguna de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100.

En un aspecto, se proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternatively consiste básicamente en, o aún más consiste en, las SEQ ID NOS: 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 ninguna de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100.

En un aspecto, se proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternatively consiste básicamente en, o aún más consiste en, la región C-terminal que contiene al menos 10, o alternatively al menos 15, o alternatively al menos 20, o alternatively al menos 25, o alternatively al menos 30, aminoácidos C-terminales de un polipéptido del grupo de un polipéptido DNABII, un polipéptido IHF, un polipéptido HU, las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o las identificadas en la Tabla 8, la Tabla 10 o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos.

En un aspecto, se proporciona un polipéptido aislado o recombinante del grupo de:

- un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 12 y 13;
- un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 14 y 15;
- un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 16 y 17;
- un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 18 y 19;
- un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 20 y 21;
- un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 23 y 24;
- un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 25 y 26;
- un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 30 y 31;
- un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 32 y 33;
- un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 34 y 35;
- un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 337 y 338; o
- un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 339 y 340;

con la condición de que el polipéptido no sea ninguno del tipo natural o uno cualquiera de IHF alfa, IHF beta o las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100.

En un aspecto, se proporciona un polipéptido aislado o recombinante del grupo de:

- un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 12 y 13;
- un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 14 y 15;
- un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 16 y 17;
- un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 18 y 19;
- un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 20 y 21;
- un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 23 y 24;
- un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 25 y 26;
- un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 30 y 31;
- un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 32 y 33;
- un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 34 y 35;
- un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 337 y 338; o
- un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 339 y 340;

con la condición de que el polipéptido no sea ninguno del tipo natural o uno cualquiera de IHF alfa, IHF beta o las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100.

También se proporcionan polipéptidos aislados recombinantes que comprenden, o alternatively consisten básicamente en, o aún más consistente en, dos o más, o tres o más o cuatro o más, o múltiples de los polipéptidos aislados identificados anteriormente, incluyendo fragmentos y equivalentes de los mismos. Algunos ejemplos de tales polipéptidos incluyen polipéptidos aislados que comprenden las SEQ ID NOS: 1 a 4 y/o 12 a 29, y/o 30 a 33, y/o 30 a 35, por ejemplo, las SEQ ID NOS: 1 y 2, o alternatively 1 y 3 o alternatively 1 y 4, o alternatively 2 y 3, o alternatively las SEQ ID NOS: 1, 2 y 3 o alternatively 2, 3 y 4, o alternatively 1, 3 y 4 o polipéptidos equivalentes, cuyos ejemplos se muestran en la Tabla 9. Los polipéptidos pueden estar en cualquier orientación, por ejemplo, las SEQ ID NOS: 1, 2, y 3 o las SEQ ID NOS: 3, 2 y 1 o alternatively las SEQ ID NOS: 2, 1 y 3, o alternatively 3, 1 y 2, o alternatively 11 y 12, o alternatively 1 y 12, o alternatively 2 y 12, o alternatively 1 y 12, o alternatively 2 y 13, o alternatively 12, 16 y 1, o alternatively 1, 16 y 12.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un polipéptido aislado recombinante que comprende las SEQ ID NOS: 1 o 2 y 3 o 4 o un polipéptido o polipéptido recombinante que comprende, o alternatively consiste básicamente en, o aún más consiste en un aminoácido que corresponde a fragmentos de una proteína DNABII tal como los fragmentos β -3 y/o α -3 de un microorganismo *Haemophilus influenzae* IHF α o IHF β , cuyos ejemplos no limitantes incluyen las SEQ ID NOS: 12 a 27, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los polipéptidos, cuyos ejemplos se muestran en la Tabla 9. En un aspecto, se excluyen específicamente polipéptidos aislados de tipo natural, por ejemplo, que el polipéptido no sea ninguna de las SEQ ID NOS: 6 a 11 o una secuencia de tipo natural identificada en la Tabla 8. En esta realización, la SEQ ID NO: 1 o 2 o un polipéptido que comprende, o alternatively consiste básicamente en, o aún más consiste en un aminoácido que corresponde a los fragmentos β -3 y/o α -3 de un microorganismo *Haemophilus influenzae* IHF α o IHF β , cuyos ejemplos no limitantes incluyen las

- SEQ ID NOS: 12 a 27 y 30 a 33 o un equivalente de cada uno de los mismos, está situado corriente arriba o en el extremo amino terminal de la SEQ ID NO: 3 o 4 o un fragmento o un equivalente de la misma. En otro aspecto, el polipéptido aislado comprende la SEQ ID NO: 3 o 4 o un polipéptido que comprende, o alternatively consiste básicamente en, o aún más consiste en un aminoácido que corresponde a los fragmentos β -3 y/o α -3 de un microorganismo *Haemophilus influenzae* IHF α o IHF β , cuyos ejemplos no limitantes incluyen las SEQ ID NOS: 12 a 27, o un equivalente de cada uno de los mismos, está situado corriente arriba o en el extremo amino terminal de la SEQ ID NO: 1 o 2 o un equivalente de la misma.
- En cualquiera de las realizaciones anteriores, se puede añadir un conector peptídico a los extremos N-terminal o C-terminal del polipéptido, fragmento o equivalente del mismo. En un aspecto, el conector une los polipéptidos de la presente divulgación, por ejemplo, las SEQ ID NOS: 1 a 4, 28, 29, 34, o 35 o 30 a 33, 34, o 35 o un polipéptido que comprende, o alternatively consiste básicamente en, o aún más consiste en un aminoácido que corresponde a los fragmentos β -3 y/o α -3 de un microorganismo *Haemophilus influenzae* IHF α o IHF β , cuyos ejemplos no limitantes incluyen las SEQ ID NOS: 12 a 27 o un equivalente de cada uno de los mismos. Un "conector" o "conector peptídico" se refiere a una secuencia peptídica unida al extremo N-terminal o al extremo C-terminal de una secuencia polipeptídica. En un aspecto, el conector tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de aminoácido de longitud o alternatively de 2 a aproximadamente 10, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 restos de aminoácido de longitud. Un ejemplo de un conector peptídico es Gly-Pro-Ser-Leu-Lys-Leu (SEQ ID NO: 37).
- Además se proporciona un fragmento o un equivalente del polipéptido aislado o recombinante de uno cualquiera de los polipéptidos identificados anteriormente así como un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o alternatively consiste básicamente en, o aún más consiste en, dos o más de los polipéptidos aislados recombinantes identificados anteriormente.
- Aún más, se proporciona un polinucleótido que interfiere con la unión del ADN microbiano con un polipéptido o fragmento o equivalente del mismo, por ejemplo, la SEQ ID NO: 36, o un polinucleótido de cruce de cuatro vías que se parece a una unión de Holliday, un polinucleótido de cruce de 3 vías que se parece a una horquilla de replicación, un polinucleótido que tiene flexibilidad inherente o un polinucleótido doblado; un polinucleótido aislado recombinante que codifica un polipéptido descrito anteriormente o un anticuerpo o un fragmento del mismo, que se puede unir operativamente a elementos reguladores necesarios para la expresión y/o la replicación del polinucleótido. El polinucleótido puede estar contenido dentro de un vector.
- También se proporciona una célula hospedadora aislada que comprende, o alternatively consiste básicamente en, o aún más consiste en, un polipéptido aislado o recombinante descrito anteriormente, un polinucleótido de cruce de cuatro vías que se parece a una unión de Holliday, un polinucleótido de cruce de 3 vías que se parece a una horquilla de replicación, un polinucleótido que tiene flexibilidad inherente o un polinucleótido doblado; un polinucleótido aislado o recombinante como se ha descrito anteriormente, o un vector como se ha descrito anteriormente.
- En un aspecto, la célula es una célula presentadora de antígeno aislada que comprende el polipéptido recombinante aislado. En un aspecto adicional, el polipéptido está presente en la superficie de la célula, tal como una célula dendrítica. En un aspecto adicional, la célula presentadora de antígeno está transfectada con uno o más polinucleótidos que codifican el polipéptido.
- Aún más, se proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que reconoce y se une específicamente al polipéptido aislado o recombinante que se ha descrito anteriormente, incluyendo un fragmento o un equivalente del polipéptido. Algunos ejemplos no limitantes de anticuerpos incluyen un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un derivado de anticuerpo, un anticuerpo remodelado superficialmente, un dianticuerpo, un anticuerpo quimérico, un derivado de anticuerpo, un anticuerpo humano recombinante, o un fragmento de anticuerpo. En un aspecto particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Aún más, se proporciona una línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal.
- La presente divulgación también proporciona polinucleótidos aislados recombinantes que codifican uno o más de los polipéptidos aislados recombinantes o anticuerpos o un fragmento de los mismos identificados anteriormente. Además, se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos aislados. En un aspecto donde más de un polipéptido aislado de la presente divulgación, los polinucleótidos aislados pueden estar contenidos en un vector policistrónico.
- Además, se proporcionan células hospedadoras aisladas que comprenden uno o más de los polipéptidos aislados recombinantes o los polinucleótidos aislados recombinantes o los vectores, descritos en el presente documento. En un aspecto, la célula hospedadora aislada es una célula procariota o una célula eucariota tal como una célula presentadora de antígeno, por ejemplo una célula dendrítica.
- Los polinucleótidos, polipéptidos, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, vectores o células hospedadoras pueden comprender además una marca detectable.

También se proporcionan composiciones que comprenden un vehículo y uno o más de un polipéptido aislado o recombinante de la divulgación, un polinucleótido aislado recombinante de la divulgación, un vector de la divulgación, una célula hospedadora aislada de la divulgación, o un anticuerpo de la divulgación. Los vehículos pueden ser uno o más de un soporte sólido, un dispositivo médico tal como una endoprótesis vascular o un implante dental, o un líquido tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden comprender además un adyuvante, un antimicrobiano o un péptido antigénico.

Las composiciones pueden comprender además agentes biológicamente activos adicionales. Un ejemplo no limitante de tales es un agente antimicrobiano tal como otros componentes de vacuna (es decir, péptidos antigénicos) tales como antígenos superficiales, por ejemplo una proteína OMP P5, rsPilA, OMP 26, OMP P2, o Pilina de Tipo IV (véanse Jurcisek y Bakaletz (2007) J. of Bacteriology 189(10):3868-3875 y Murphy, TF, Bakaletz, LO y Smeesters, PR (2009) The Pediatric Infectious Disease Journal, 28:S121-S126) y agentes antimicrobianos.

La presente divulgación también proporciona un método para producir un péptido antigénico por crecimiento o cultivo de una célula hospedadora que comprende un polinucleótido aislado que codifica un péptido antigénico como se ha descrito anteriormente en condiciones que favorecen la expresión del polinucleótido. El polipéptido producido mediante este método se puede aislar para uso adicional *in vitro* o *in vivo*.

También se proporciona un kit para uso diagnóstico o terapéutico que comprende una composición como se ha descrito anteriormente e instrucciones para su uso. También se proporciona un kit para llevar a cabo análisis sistemáticos para nuevos fármacos y/o terapias de combinación como se proporciona en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1A** es una biopelícula formada en el oído medio de una chinchilla por la cepa 86-028NP de NTHI y marcada para pilina Tfp de NTHI (aparece en forma de motas de color blanco o gris claro y grupos pequeños en el fondo de esta imagen), así como con DAPI para el marcaje de ADN bicatenario (ADNbc) (aparece en forma de cadenas superpuestas de color gris oscuro y haces de material con masas intermitentes en el fondo de esta imagen). Esta figura se ha reproducido de Jurcisek y Bakaletz (2007) J. of Bacteriology 189(10):3868-3875. La **Figura 1B** es el inmunomarcaje de lavado broncoalveolar (BAL) del pulmón de un niño con fibrosis quística. El pulmón de un niño con fibrosis quística se lavó mediante BAL y la materia particulada del lavado se congeló y se fijó a portaobjetos para inmunomarcaje. La materia particulada congelada se sometió a inmunomarcaje con un anticuerpo anti-IHF. La presencia de focos positivos de IHF en la biopelícula de pacientes con fibrosis quística humana muestra a modo de ejemplo que la etiología de la fibrosis quística humana incluye una biopelícula con IHF en los vértices del ADNbc. La **Figura 1C** muestra secreciones de seno humano recogidas en el momento de una cirugía de seno e incluidas en el medio de congelación OCT (medio de temperatura de corte óptima, disponible comercialmente de Fisher Scientific n.º de Cat. 14-373-65). Se cortaron secciones congeladas de 10 µm y se marcaron con anti-IHF (aparece en forma de grupos de color gris). El ADNbc de la muestra se tiñó con un tinte fluorescente, DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, disponible comercialmente de Invitrogen). La presencia de focos positivos de IHF en la biopelícula de pacientes con sinusitis muestra a modo de ejemplo que la etiología de la sinusitis humana incluye una película con IHF en los vértices del ADNbc.

La **Figura 2** es un marcaje inmunohistoquímico de ADN bicatenario (aparece en forma de cadenas de color blanco en esta imagen) en una biopelícula de NTHI formada en el oído medio de una chinchilla. Se observó marcaje positivo para IHF (según se indica mediante las flechas que indican los lugares puntuados en el panel medio de esta imagen de 3 paneles) en casi un 100 % de los vértices formados por el ADNbc. La distancia media entre vértices fue de aproximadamente 6 µm, o aproximadamente 18 kb entre cada vértice si se suponen 0,34 nm por base de ADN para ADN de forma B. Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, las únicas proteínas que poseen epítomos que presentan reacción cruzada con anti-IHF son HU e IHF. Por lo tanto, basándose en estas observaciones, pareció que no solo había proteínas DNABII extracelulares en la matriz de la biopelícula de NTHI sino que, de forma más importante, estas proteínas parecían estar situadas exclusivamente en las cadenas de ADN que se parecen a estructuras cruciformes en su conformación (véase la Figura 1, Panel B, sección inferior), sugiriendo fuertemente de ese modo su papel en la mediación de la conformación doblada resultante del ADN.

La **Figura 3** muestra que los anticuerpos dirigidos frente a IHF invirtieron una biopelícula de NTHI establecida formada en un portaobjetos con cámara. La **Figura 3A** muestra una biopelícula tratada sin ningún anticuerpo específico. La **Figura 3B** muestra una biopelícula tratada con suero de conejo no comprometido. Se ha de observar la biopelícula de NTHI robusta con abundantes torres (aparecen en forma de áreas agrupadas de color blanco a gris claro) y canales de agua (espacios de color negro). La **Figura 3C** es una biopelícula tratada con anti-IHF. Se ha de observar la erradicación de la estructura de la biopelícula después del tratamiento con un anti-IHF. Permanecen NTHI individuales (aparecen en forma de manchas puntuales pequeñas de color blanco a gris claro) y torres cortas y dispersas (aparecen en forma de áreas agrupadas más densas de color blanco a gris claro). Las Figuras 3D y 3E representan además que los anticuerpos dirigidos frente a IHF invierten una biopelícula de NTHI establecida. Como se muestra en la **Figura 3** (Panel E), la biopelícula mostró una pérdida drástica de estructura tridimensional cuando se comparó con una biopelícula incubada con un suero no comprometido (**Figura 3**, Panel D). Mediante análisis COMSTAT de ensayos con múltiples duplicados, los parámetros medidos de altura de la biopelícula, biomasa y

grosor de la biopelícula disminuyeron todos ellos en un promedio de más de un 80 % después de incubación con anti-IHF.

La Figura 4A y la Figura 4B son gráficos que muestran que el tratamiento de una biopelícula establecida formada mediante NTHI con anti-IHF da como resultado más NTHI liberado al sobrenadante. Las biopelículas de NTHI cultivadas durante dieciséis (16) horas en portaobjetos con cámara se trataron de forma simulada con medio estéril (sBHI) o se trataron con suero de conejo no comprometido o anti-IHF de conejo. Seis horas después (Figura 4A) o 10 horas después (Figura 4B) se recogieron y analizaron los sobrenadantes. Se ha de observar el mayor número de NTHI en el sobrenadante después del tratamiento con anti-IHF. La incubación con anti-IHF dio como resultado un aumento considerable en bacterias planctónicas disponibles para cultivo del medio en el portaobjetos con cámara en aproximadamente 6 h, y aumentando considerablemente a las 10 horas de incubación. Estos resultados sugirieron la liberación de bacterias de la matriz de la biopelícula.

La **Figura 5** muestra que los resultados de una inmunización transcutánea con IHF redujeron una biopelícula establecida en el oído medio. Se ha de observar que las ampollas se calificaron ciegamente en una escala de 0 a 4+ de masa de biopelícula remanente relativa.

La **Figura 6A** es un mapa que indica los restos de aminoácido de IHF que interactúan con o se unen a otro IHF en un dímero IHF-IHF (indicado por triángulos en el nivel superior) o interactúan con o se unen a ADN (indicado mediante triángulos en el nivel inferior). El péptido está dividido por las barras verticales cortas en regiones que contienen 3 aminoácidos.

La **Figura 6B** representa gráficamente la interacción del ADN microbiano con un IHF.

La **Figura 7** representa la reducción de las biopelículas formadas por *S. aureus*, *N. gonorrhoeae* y *P. aeruginosa* tras incubación con anti-IHF de conejo en comparación con la incubación con suero de conejo no comprometido.

La **Figura 8** muestra el efecto de la incubación de biopelículas formadas *in vitro* por *E. coli* con suero no comprometido o con suero anti-IHF. Se muestran imágenes representativas de biopelículas en los Paneles A-F con la altura de las biopelículas individuales mostrada a la derecha de cada imagen, mientras que en las tablas al final de cada fila se muestran los valores medios en términos del porcentaje de reducción en la altura de la biopelícula, biomasa y grosor medio que está mediado por la incubación con anti-IHF. Paneles A y B - cepa precursora MG1655; Paneles C y D - deficiente en HU doble mutante *hupA*, *hupB*; Paneles E y F - deficiente en IHF doble mutante *himD*, *himA*. Se ha de observar la capacidad del suero anti-IHF para reducir la biomasa inducida por el aislado precursor o el mutante deficiente en HU, pero no la cepa deficiente en IHF, según lo esperado.

La **Figura 9A** demuestra que la inmunización con IHF mediante una ruta de suministro transcutánea indujo la formación de anticuerpos que redujeron significativamente la biomasa de una biopelícula inducida por NTHI residente en los oídos medios de chinchillas ($p < 0,001$).

La **Figura 9B** presenta imágenes representativas de biomasas que permanecieron en los oídos de animales inmunizados solo con adyuvante frente a los inmunizados con IHF + adyuvante. La última columna de la Figura 9B muestra imágenes de biomasas en los extremos del sistema de calificación usado aquí. La imagen superior es la de un oído medio que contiene una biomasa que recibiría una calificación de 4+, mientras que la imagen inferior es un oído medio sano que recibiría una calificación de 0, que indica que no hay biomasa.

La **Figura 10A** muestra tinción de H&E de una sección congelada de una biopelícula recuperada del oído medio de una chinchilla que se había inmunizado mediante TCI solo con adyuvante frente a inmunización con IHF + adyuvante. Se ha de observar el aspecto condensado y colapsado de la biopelícula recuperada del animal inmunizado con IHF + adyuvante en comparación con el inmunizado solo con adyuvante. Las imágenes mostradas en el Panel A se muestran con ampliaciones idénticas para ilustrar las diferencias en altura y densidad entre las dos biomasas representativas.

La **Figura 10B** demuestra que hay una reducción significativa de la carga bacteriana presente en los oídos medios de animales inmunizados solo con adyuvante frente a los inmunizados con IHF + adyuvante ($p < 0,05$).

La **Figura 11** representa un ensayo de desplazamiento de movilidad electroforético que demostró que IHF formó complejos específicos con ADNbc en las condiciones usadas para inmunizar chinchillas.

La **Figura 12** representa gráficamente que la inmunización transcutánea con IHF nativo + adyuvante indujo la formación de anticuerpos que redujeron significativamente la biomasa residente en los oídos medios de chinchillas en comparación con el receptor de solo adyuvante ($p < 0,017$), solo ADNbc ($p < 0,003$) o IHF al que ya se había unido ADNbc + adyuvante ($p < 0,001$). Este resultado sugirió que la unión de ADNbc a IHF nativo enmascaró los epítomos protectores de este miembro de la familia de DNABII.

La **Figura 13** representa el reconocimiento de IHF (flechas) por anticuerpo en suero después de inmunización

subcutánea con IHF o con IHF al que se había unido ADNbc.

La **Figura 14** es una demostración de la sinergia entre una concentración subóptima de suero anti-IHF (1:200) y ADNasa I individualmente, y a continuación mezclados (Figura 14A); una concentración subóptima de anti-IHF (1:100) y suero de anti-proteína P5 de membrana exterior (OMP P5) individualmente, y a continuación mezclados (Figura 14B); o la de una dilución eficaz de anti-IHF (en términos de apelmazar una biopelícula pero *no* inducir muerte celular bacteriana) y amoxicilina individualmente, y a continuación mezclados (Figura 14C). En cada una de estas situaciones, cuando se combinó cualquier agente con anti-IHF, el efecto de apelmazamiento de biopelícula y/o eliminación observado fue mayor que el observado cuando se usó solo cualquier agente individual. Nota: la altura de la biopelícula (en micrómetros) se indica debajo de cada imagen.

La **Figura 15** es una comparación de *E. coli* tratada con suero de conejo sin comprometer o suero anti-IHF de conejo (fila superior de imágenes); con suero de rata sin comprometer o suero anti-HNS de rata (fila media de imágenes); o con suero de ratón sin comprometer o suero anti-DPS de ratón (fila inferior de imágenes). Se ha de observar la reducción marcada en biomasa después del tratamiento con suero anti-IHF y que, sin embargo, ni el suero anti-HNS ni el suero anti-DPS indujeron una reducción en la biomasa como se usa en el presente documento. El tratamiento con anti-IHF dio como resultado una reducción de un 48,2 % en la altura de la biopelícula, una reducción de un 81 % en el grosor medio de la biopelícula, y una reducción de un 64,5 % en la biomasa. Por el contrario, el tratamiento con anti-HNS o anti-DPS dio como resultado una reducción de altura nominal de un 0,7 % y un 4,2 %, respectivamente, una reducción en el grosor medio de un 5,8 % y un 6,4 %, respectivamente, y una reducción en la biomasa de un 0,3 % y -17,4 %, respectivamente.

La **Figura 16** muestra hibridación *in situ* para demostrar la disposición espacial relativa de ADN de un organismo hospedador o de la bacteria cuando se organiza en una biopelícula. En cada circunstancia, el ADN aparece como áreas más brillantes y más blancas en el fondo de estas imágenes en blanco y negro. El ADN del hospedador está marcado más densamente en la imagen superior derecha, lo que demuestra su distribución más pesada en la periferia externa de la biopelícula, mientras que el ADN de la bacteria está más densamente marcado en la imagen inferior izquierda de esta composición de 4 paneles, demostrando de ese modo su distribución más densa en los tramos internos de la biopelícula.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención se define en las reivindicaciones. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende habitualmente el experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Todas las secuencias de nucleótidos provistas en el presente documento se presentan en la dirección 5' a 3'. Aunque se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los que se describen en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos, dispositivos y materiales preferentes. Nada de lo expuesto en el presente documento se debe interpretar como una admisión de que la invención no tiene derecho a ser anterior a dicha divulgación en virtud de la invención anterior.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de cultivo tisular, inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están dentro de las habilidades de la técnica. Véanse, por ejemplo, Sambrook y Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición; la serie Ausubel *et al.* eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; la serie *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 y Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual de Basic Technique*, 5ª edición; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.683.195; Hames y Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames y Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation*; Immobilized Cells y Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller y Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer y 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*.

Todas las indicaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración, y peso molecular, incluyendo intervalos, son aproximaciones que varían (+) o (-) en incrementos de 1,0 o 0,1, según sea apropiado o alternativamente mediante una variación de +/- 15 %, o alternativamente un 10 % o alternativamente un 5 % o alternativamente un 2 %. Se ha de entender que, aunque no siempre se indique explícitamente, todas las indicaciones numéricas están precedidas por el término "aproximadamente". También se ha de entender que, aunque no siempre se indique explícitamente, los reactivos descritos en el presente documento son meramente a modo de ejemplo y que se conocen equivalentes de los mismos en la técnica.

Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas en singular "un", "uno", "una", "el" y "la" incluye las referencias en plural a menos que el contexto lo dicte claramente de otro modo. Por ejemplo, la expresión

"un polipéptido" incluye una pluralidad de polipéptidos, incluyendo las mezclas de los mismos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" pretende indicar que la composición y los métodos incluyen los elementos enumerados, pero no excluyen otros. "Que consiste básicamente en", cuando se usa para definir composiciones y métodos, indicará que se excluyen otros elementos de cualquier significación esencial en la combinación para el uso pretendido. De ese modo, una composición que consiste básicamente en los elementos que se definen en el presente documento no debería excluir contaminantes traza del método de aislamiento y purificación y vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes, y similares. "Que consiste en" indicará que se excluyen más de elementos traza y otros ingredientes y etapas de método sustanciales para administrar las composiciones de la presente divulgación. Las realizaciones definidas mediante cada uno de estos términos de transición están dentro del ámbito de la presente divulgación.

Un "biopelícula" indica una comunidad organizada de microorganismos que en ocasiones se adhiere a la superficie de una estructura, que puede ser orgánica o inorgánica, junto con los polímeros tales como ADN que segregan y/o liberan. Las biopelículas son muy resistentes a microbóticos y agentes antimicrobianos. Viven en tejidos gingivales, dientes y restauraciones, causando caries y enfermedad periodontal, también conocida como enfermedad de placa periodontal. También causan infecciones crónicas del oído medio. Las biopelículas también se pueden formar sobre la superficie de implantes dentales, endoprótesis vasculares, líneas de catéter y lentes de contacto. Crecen sobre marcapasos, reemplazos de válvula cardíaca, articulaciones artificiales y otros implantes quirúrgicos. Los Centros de control de enfermedades estima que más de un 65 % de las infecciones nosocomiales (adquiridas en el hospital) están causadas por biopelículas. Causan infecciones vaginales crónicas y conducen a infecciones sistémicas que amenazan la vida en personas con sistemas inmunes comprometidos. Las biopelículas también están implicadas en numerosas enfermedades. Por ejemplo, los pacientes con fibrosis quística tienen infecciones de *Pseudomonas* que a menudo resultan en biopelículas resistentes a antibióticos.

La expresión "inhibir, competir o valorar" indica una reducción en la formación de la matriz de ADN/proteína (por ejemplo como se muestra la Figura 1) que es un componente de una biopelícula microbiana.

Un "polipéptido o proteína DNABII" indica una proteína o un polipéptido de unión a ADN que está compuesto por dominios de unión a ADN y de ese modo tiene una afinidad específica o general por el ADN microbiano. En otro aspecto, se unen al ADN en el surco menor. Algunos ejemplos no limitantes de proteínas DNABII son una proteína del factor de integración del hospedador (IHF) y una proteína de tipo histona de la cepa U93 de *E. coli* (HU). Otras proteínas de unión a ADN que pueden estar asociadas a la biopelícula incluyen DPS (n.º de acceso a Genbank: CAA49169), H-NS (n.º de acceso a Genbank: CAA47740), Hfq (n.º de acceso a Genbank: ACE63256), CbpA (n.º de acceso a Genbank: BAA03950) y CbpB (n.º de acceso a Genbank: NP_418813).

Una proteína de "factor de integración del hospedador" o "IHF" es una proteína bacteriana que usan los bacteriófagos para incorporar su ADN a la bacteria hospedadora. También se unen al ADN microbiano extracelular. Los genes que codifican las subunidades de proteína IHF en *E. coli* son los genes *himA* (n.º de acceso a Genbank: POA6X7.1) y *himD* (POA6Y1.1). Se encuentran homólogos para estos genes en otros organismos, y se pueden encontrar péptidos que corresponden a estos genes de otros organismos en la Tabla 10.

"HMGB1" es una proteína de alta movilidad del grupo de caja 1 (HMGB) que se informa que se une a y distorsiona el surco menor del ADN y es un ejemplo de un agente interferente. La proteína y el polipéptido recombinantes aislados están disponibles en el mercado en Atgenglobal, ProSpecBio, Protein1 y Abnova.

"HU" o "proteína de tipo histona de la cepa U93 de *E. coli*" se refiere a una clase de proteínas heterodiméricas asociadas por lo general a *E. coli*. Se conoce que las proteínas HU se unen a las juntas del ADN. Se han aislado proteínas relacionadas de otros microorganismos. La secuencia de aminoácidos completa de HU de *E. coli* se informó por parte de Laine *et al.* (1980) Eur. J. Biochem. 103(3):447-481. Los anticuerpos frente a la proteína HU están disponibles en el mercado en Abeam. Los genes que codifican las subunidades de la proteína HU en *E. coli* son *hupA* y *hupB* que corresponden a las SEQ ID NOS: 28 y 29, respectivamente. Se encuentran homólogos para estos genes en otros organismos, y se pueden encontrar péptidos que corresponden a estos genes de otros organismos en la Tabla 10.

La expresión "antígenos superficiales" o "proteínas superficiales" se refiere a proteínas o péptidos sobre la superficie de células tales como células bacterianas. Algunos ejemplos de antígenos superficiales son proteínas de la membrana exterior tales como OMP P5 (n.º de acceso a Genbank: YP_004139079.1), OMP P2 (n.º de acceso a Genbank: ZZX87199.1), OMP P26 (n.º de acceso a Genbank: YP_665091.1), rsPilA o PilA soluble recombinante (n.º de acceso a Genbank: EFU96734.1) y Pilina de Tipo IV (n.º de acceso a Genbank: YP_003864351.1).

La expresión "*Haemophilus influenzae*" se refiere a una bacteria patógena que puede causar numerosas infecciones diferentes tales como, por ejemplo, infecciones del oído, infecciones oculares, y sinusitis. Se han aislado numerosas cepas diferentes de *Haemophilus influenzae* y tienen un gen o proteína IhfA. Algunos ejemplos no limitantes de diferentes cepas de *Haemophilus influenzae* incluyen Rd KW20, 86-028NP, R2866, PittGG, PittEE, R2846, y 2019.

"ADN microbiano" indica ADN monocatenario o bicatenario de un microorganismo que produce una biopelícula.

"Inhibir, prevenir o descomponer" una biopelícula indica la reducción profiláctica o terapéutica en la estructura de una biopelícula. Un ejemplo de descomposición o reducción de una biopelícula se muestra en la Figura 5.

Un "agente interferente" indica un agente que uno cualquiera o más de compite, inhibe, previene, valora un polipéptido DNABII tal como IHF a un ADN microbiano o también descompone una biopelícula microbiana. Puede ser uno cualquiera o más de una molécula química o biológica. Por ejemplo, IHF se puede unir específicamente a, doblar o distorsionar estructuras de ADN tales como ADN que contiene uniones de cuatro vías, productos de cisplatino, bucle de ADN o protuberancias de bases. Algunos ejemplos de tales agentes, sin limitación, incluyen (1) moléculas pequeñas que inhiben la actividad de unión a ADN de IHF, (2) moléculas pequeñas tales como poliamidas y espermina que compiten con IHF en la unión a ADN, (3) polipéptidos tales como fragmentos peptídicos de IHF que compiten con IHF en la unión a ADN, (4) anticuerpos y fragmentos de los mismos dirigidos a IHF, o (5) un polinucleótido de cuatro vías o doblado 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 IHF a un ácido nucleico" se refiere a los apartados anteriores (1) o (2) e incluyen los que se unen al ADN en el surco menor, es decir, moléculas de unión al surco menor. Un "polinucleótido de cuatro vías" indica un polinucleótido que contiene una cruce de cuatro vías, también conocida como unión de Holliday, entre cuatro cadenas de ADN.

Un "polinucleótido doblado" indica un polinucleótido bicatenario que contiene un bucle pequeño en una cadena que no está emparejado con la otra cadena. En algunas realizaciones, el bucle es de 1 base a 20 bases de longitud, o alternativamente de 2 bases a aproximadamente 15 bases de longitud, o alternativamente de aproximadamente 3 bases a aproximadamente 12 bases de longitud, o alternativamente de 4 bases a aproximadamente 10 bases de longitud, o tiene alternativamente aproximadamente 4, 5, o 6, o 7, o 8, o 9, o 10 bases.

"Polipéptidos que compiten con IHF en la unión a ADN" indica proteínas o péptidos que compiten con IHF en la unión a estructuras de ADN dobladas o distorsionadas pero que no forman una biopelícula con el ADN. Algunos ejemplos incluyen, sin limitación, fragmentos de IHF que incluyen uno o más dominios de unión a ADN del IHF, o los equivalentes biológicos de los mismos. Los dominios de unión a ADN se muestran en la Figura 6.

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

Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se usan de forma intercambiable en su sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar unidas por enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad puede estar unida por otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos y no se establece ninguna limitación en el número máximo de aminoácidos que puede comprender una secuencia de proteína o péptido. 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 tanto D como L, análogos de aminoácidos y peptidomiméticos.

Un "polipéptido C-terminal" indica al menos los 10, o alternativamente al menos los 15, o alternativamente al menos los 20, al menos los 25 aminoácidos C-terminales o alternativamente la mitad de un polipéptido. En otro aspecto, para polipéptidos que contienen 90 aminoácidos, el polipéptido C-terminal comprendería de 46 a 90 aminoácidos. En un aspecto, el término indica los 20 aminoácidos C-terminales desde el extremo carboxi terminal.

Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan de forma intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden llevar a cabo cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: un gen o un fragmento de un gen (por ejemplo, una sonda, cebador, etiqueta EST o SAGE), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosomal, ARNi, 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 están presentes, las modificaciones en la estructura del nucleótido se pueden impartir antes o después del montaje del polinucleótido. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcaje. El término también se refiere a moléculas tanto bicatenarias como monocatenarias. A menos que se especifique o requiera de otro modo, cualquier realización de la presente divulgación que sea un polinucleótido incluye tanto la forma bicatenaria como cualquiera de las dos formas monocatenarias complementarias que se conoce o predice que componen la forma bicatenaria.

Un polinucleótido se compone de una secuencia específica de cuatro bases de nucleótidos: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); y uracilo (U) por timina cuando el polinucleótido es ARN. De ese modo, la expresión "secuencia de polinucleótidos" es la representación alfabética de una molécula de polinucleótido. Esta representación alfabética se puede producir en bases de datos en una computadora que tiene una unidad central de procesamiento y usar para aplicaciones bioinformáticas tales como genómica funcional y 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 polipéptidos. La expresión "ácido nucleico aislado o recombinante" pretende incluir fragmentos de ácido nucleico que no se producen de forma 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 se aíslan de otras proteínas celulares y pretende incluir tanto polipéptidos purificados como recombinantes. En otras realizaciones, el término "aislado o recombinante" significa separado de los constituyentes, celulares y de otro tipo, a los que la célula, tejido, polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento o fragmentos del mismo, están normalmente asociados en la naturaleza. Por ejemplo, una célula aislada es una célula que está separada del tejido o las células de fenotipo o genotipo diferentes. Un polinucleótido aislado se separa de los nucleótidos contiguos 3' y 5' con los que normalmente está asociado en su entorno nativo o natural, por ejemplo, en el cromosoma. Como es evidente para los expertos en la materia, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento o fragmentos del mismo, de origen no natural, no requiere "aislamiento" para distinguirlo de su contrapartida de origen natural.

Se ha de inferir sin indicación explícita y a menos que se pretenda de otro modo, que cuando la presente divulgación se refiera a un polipéptido, una proteína, un polinucleótido o un anticuerpo, se pretende que un equivalente o un equivalente biológico del mismo se encuentre dentro del ámbito de la presente divulgación. Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "equivalente biológico del mismo" sea sinónima de "equivalente del mismo" cuando se hace referencia a una proteína, anticuerpo, fragmento, polipéptido o ácido nucleico de referencia, refiriéndose a aquellos que tienen una homología mínima y al mismo tiempo mantienen la estructura o funcionalidad deseada. A menos que se indique específicamente en el presente documento, se contempla que cualquier polinucleótido, polipéptido o proteína mencionado en el presente documento también incluya equivalentes de los mismos. En un aspecto, un polinucleótido equivalente es el que se hibrida en condiciones rigurosas al polinucleótido o complemento del polinucleótido como se describe en el presente documento para uso en los métodos descritos. En otro aspecto, un anticuerpo o polipéptido de unión a antígeno equivalente indica el que se une con al menos un 70 %, o alternativamente al menos un 75 %, o alternativamente al menos un 80 %, o alternativamente al menos un 85 %, o alternativamente al menos un 90 %, o alternativamente al menos un 95 % de afinidad o una afinidad superior a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de referencia. En otro aspecto, el equivalente del mismo compete por la unión del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno a su antígeno en un ensayo ELISA competitivo. En otro aspecto, un equivalente indica al menos un 80 % de homología o identidad y alternativamente, al menos aproximadamente un 85 %, o alternativamente menos aproximadamente un 90 %, o alternativamente al menos aproximadamente un 95 %, o alternativamente un 98 % de homología o identidad y exhibe una actividad biológica básicamente equivalente con respecto a la proteína, polipéptido o ácido nucleico de referencia. En la Tabla 9 se proporcionan ejemplos de polipéptidos biológicamente equivalentes que identifican sustituciones de aminoácidos conservativas con respecto a las secuencias de aminoácidos preferentes.

Un polinucleótido o una región de un polinucleótido (o un polipéptido o una región de un polipéptido) que tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, un 80 %, 85 %, 90 %, o un 95 %) de "identidad de secuencia" con respecto a otra secuencia significa que, cuando se alinean, el porcentaje de bases (o aminoácidos) es igual en la comparación de las dos secuencias. La alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los que se describen en *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds. 1987) Suplementos 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferentemente, se usan los parámetros por defecto para la alineación. Un programa de alineación preferente es BLAST, usando los parámetros por defecto. En particular, son programas preferentes BLASTN y BLASTP, usando los siguientes parámetros por defecto: Código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; corte = 60; espera = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = ALTA PUNTUACIÓN; Bases de datos = no redundante, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS traducciones + SwissProtein + SPupdate + PIR. Se pueden encontrar detalles de estos programas en la siguiente dirección de Internet: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST. La identidad de secuencia y el porcentaje de identidad se determinaron por incorporación de los mismos en clustalW (disponible en la dirección de Internet: [//align.genome.jp/](http://align.genome.jp/), último acceso el 7 de marzo de 2011).

"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 por comparación de una posición en cada secuencia que puede estar alineada con fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o el mismo aminoácido, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. El grado de homología entre secuencias es función del número de posiciones emparejadas u homólogas compartidas por las secuencias. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos de un 40 % de identidad, o alternativamente menos de un 25 % de identidad, con una de las secuencias de la presente divulgación.

"Homología" o "identidad" o "similitud" también se puede referir a dos moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas.

- 5 "Hibridación" se refiere a una reacción en la que uno o más polinucleótidos reaccionan para formar un complejo que se estabiliza mediante enlace de hidrógeno entre las bases de los restos de nucleótido. El enlace de hidrógeno se puede producir mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick, enlace de Hoogsteen, o en cualquier otra forma específica de secuencia. El complejo puede comprender dos cadenas que forman una estructura doble, tres o más cadenas que forman un complejo de múltiples cadenas, o una cadena de autohibridación individual, o cualquier combinación de estas. Una reacción de hibridación puede constituir una etapa en un proceso más extenso, tal como la iniciación de una reacción de PCR, o la escisión enzimática de un polinucleótido mediante una ribozima.

Algunos ejemplos de condiciones de hibridación rigurosas incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C; concentraciones de tampón de hibridación de aproximadamente 6x SSC a aproximadamente 10x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 25 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 4x SSC a aproximadamente 8x SSC. Algunos ejemplos de condiciones de hibridación moderadas incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C; concentraciones de tampón de hibridación de aproximadamente 9x SSC a aproximadamente 2x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 50 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 5x SSC a aproximadamente 2x SSC. Algunos ejemplos de condiciones de alta rigurosidad incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 68 °C; concentraciones de tampón de hibridación de aproximadamente 1x SSC a aproximadamente 0,1x SSC; concentraciones de formamida de aproximadamente un 55 % a aproximadamente un 75 %; y soluciones de lavado de aproximadamente 1x SSC a aproximadamente 0,1x 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 aproximadamente 1, 2, o 15 minutos. SSC es NaCl 0,15 M y tampón citrato 15 mM. Se ha de entender que se pueden emplear equivalentes de SSC usando otros sistemas de tampón.

30 Como se usa en el presente documento, "expresión" se refiere a los procesos mediante los que se transcriben polinucleótidos a ARNm y/o el proceso mediante el que el ARNm transcrito se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el polinucleótido se obtiene a partir de ADN genómico, la expresión puede incluir corte y empalme del ARNm en la célula eucariota.

35 El término "codificar", como se aplica a polinucleótidos, se refiere a un polinucleótido que se dice que "codifica" un péptido si, en su estado nativo o cuando se manipula mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia, se puede transcribir y/o traducir 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 a partir de la misma.

40 Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y similares se usan en el presente documento para indicar la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser en términos profilácticos de prevenir completa o parcialmente un trastorno o signo o síntoma del mismo, y/o puede ser en términos terapéuticos de una cura parcial o completa para un trastorno y/o efecto adverso atribuible al trastorno.

45 Prevenir indica prevenir un trastorno o efecto *in vitro* o *in vivo* en un sistema o sujeto que está predispuesto al trastorno o efecto. Un ejemplo del mismo es la prevención de la formación de una biopelícula en un sistema que está infectado con un microorganismo conocido por producirla.

50 Una "composición" pretende indicar una combinación de un agente activo y otro compuesto o composición inerte (por ejemplo, un agente o marcador detectable) o activo, tal como un adyuvante.

Una "composición farmacéutica" pretende incluir la combinación de un agente activo con un vehículo, inerte o activo, haciendo a la composición adecuada para su uso diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

55 "Vehículos farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualquier diluyente, excipiente, o vehículo que se puede usar en la composición de la divulgación. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas de suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, copolímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana. Se describen vehículos farmacéuticos adecuados en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, un texto de referencia convencional en este campo. Se seleccionan preferentemente con respecto a la forma pretendida de administración, es decir, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes y similares, y consistentes con las prácticas farmacéuticas.

Un "agente biológicamente activo" o un agente activo de la presente divulgación indica uno o más de un polipéptido aislado o recombinante, un polinucleótido aislado o recombinante, un vector, una célula hospedadora aislada, o un anticuerpo, así como composiciones que comprenden uno o más de los mismos.

La "administración" se puede efectuar en una dosis, de forma continua o intermitente a lo largo del curso de un tratamiento. Los métodos para determinar los medios más eficaces y la dosificación de una administración se conocen por los expertos en la materia y variarán con la composición usada para terapia, el fin de la terapia, la célula diana que se trata, y el sujeto que se trata. Se pueden llevar a cabo administraciones individuales o múltiples seleccionándose el nivel de dosis y el patrón por el médico a cargo del tratamiento. Se conocen en la técnica formulaciones de dosificación adecuadas y métodos de administración de los agentes. También se puede determinar la ruta de administración y el método para determinar la ruta de administración más eficaz se conoce por el experto en la materia y variará con la composición usada para el tratamiento, el fin del tratamiento, el estado de salud o la etapa de la enfermedad del sujeto que se trata, y la célula o tejido diana. Algunos ejemplos no limitantes de la ruta de administración incluyen administración oral, administración nasal, inyección, y administración tópica.

Un agente de la presente divulgación se puede administrar para terapia mediante cualquier ruta adecuada de administración. También se ha de entender que la ruta preferente variará con las condiciones y la edad del receptor, y la enfermedad que se trata.

La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para conseguir un efecto deseado. En el contexto de aplicaciones terapéuticas o profilácticas, la cantidad eficaz dependerá del tipo y la gravedad de la afección en cuestión y las características del sujeto individual, tales como estado general de salud, edad, sexo, peso corporal, y tolerancia a composiciones farmacéuticas. En el contexto de una composición inmunogénica, en algunas realizaciones la cantidad eficaz es la cantidad suficiente para dar como resultado una respuesta protectora frente a un patógeno. En otras realizaciones, la cantidad eficaz de una composición inmunogénica es una cantidad suficiente para dar como resultado la generación de anticuerpos frente al antígeno. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz es la cantidad requerida para conferir inmunidad pasiva a un sujeto con necesidad de la misma. Con respecto a composiciones inmunogénicas, en algunas realizaciones la cantidad eficaz dependerá del uso pretendido, el grado de inmunogenicidad de un compuesto antigénico particular, y la salud, capacidad de respuesta del sistema inmunitario del sujeto, además de los factores que se han descrito anteriormente. El experto en la materia podrá determinar las cantidades apropiadas dependiendo de estos y otros factores.

En el caso de una aplicación *in vitro*, en algunas realizaciones la cantidad eficaz dependerá del tamaño y la naturaleza de la aplicación en cuestión. También dependerá de la naturaleza y la sensibilidad de la diana *in vitro* y el método en uso. El experto en la materia será capaz de determinar la cantidad eficaz basándose en estas y otras consideraciones. La cantidad eficaz puede comprender una o más administraciones de un compuesto dependiendo de la realización.

La expresión "resto conjugado" se refiere a un resto que se puede añadir a un polipéptido quimérico aislado por formación de un enlace covalente con un resto del polipéptido quimérico. El resto puede unirse directamente a un resto de un polipéptido quimérico o puede formar un enlace covalente con un conector que a su vez forma un enlace covalente con un resto del polipéptido quimérico.

Un "conjugado de péptido" se refiere a la asociación mediante 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 mejora de la estabilidad o eficacia del polipéptido para su fin pretendido. En una realización, un péptido se conjuga a un vehículo, en el que el vehículo es un liposoma, una micela, o un polímero farmacéuticamente aceptable.

"Liposomas" son vesículas microscópicas que consisten en bicapas lipídicas concéntricas. Estructuralmente, los liposomas varían en tamaño y forma de tubos alargados a esferas, con dimensiones de unos pocos cientos de Angstroms a fracciones de milímetro. Los lípidos formadores de vesículas se seleccionan para conseguir un grado especificado de fluidez o rigidez del complejo final que proporciona la composición de lípidos de la capa exterior. 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 la cadena de hidrocarburo en el intervalo de 14-22, y saturados o con uno o más dobles enlaces C=C. Algunos ejemplos de lípidos capaces de producir un liposoma estable, solos o en combinación con otros componentes lipídicos son fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, cefalina, cardiolipina, ácido fosfatídico, cerebrósidos, diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE) y 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxilato de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE-mal). Los lípidos adicionales que no contienen fósforo que se pueden llegar a incorporar a los liposomas incluyen estearilamina, hexadecilamina, miristato de isopropilo, lauril sulfato de trietanolamina, sulfato de alquil-arilo, palmitato de acetilo, ricinoleato de glicerol, estearato de hexadecilo, polímeros acrílicos anfóteros, amidas de ácidos grasos polioxiethylados, y los lípidos catiónicos

mencionados anteriormente (DDAB, DODAC, DMRIE, DMTAP, DOGS, DOTAP (DOTMA), DOSPA, DPTAP, DSTAP, DC-Col). Los lípidos cargados negativamente incluyen ácido fosfatídico (PA), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidilglicerol y (DOPG), fosfato de dicetilo y también son capaces de formar vesículas. Por lo general, los liposomas se pueden dividir en tres categorías basándose en su tamaño general y la naturaleza de la estructura laminar. Las tres clasificaciones, según se desarrollan por New York Academy Sciences Meeting, "Liposomes and Their Use in Biology and Medicine," diciembre de 1977, son vesículas multilaminares (MLV), vesículas unilaminares pequeñas (SUV) y vesículas unilaminares grandes (LUV). Los agentes activos biológicos se pueden encapsular de un modo tal para administración de acuerdo con los metidos descritos en el presente documento.

Una "micela" es un agregado de moléculas de tensioactivo dispersas en un coloide líquido. Una micela habitual en solución acuosa forma un agregado con las regiones de "cabeza" hidrófilas en contacto con el disolvente circundante, secuestrando las regiones de 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 extendiéndose hacia el exterior (micela de agua en aceite). Las micelas se pueden usar para unir un polinucleótido, polipéptido, anticuerpo o composición descrita en el presente documento para facilitar un suministro eficaz a la célula o tejido diana.

La expresión "polímero farmacéuticamente aceptable" se refiere al grupo de compuestos que se pueden conjugar a uno o más polipéptidos descritos en el presente documento. Se contempla que la conjugación de un polímero al polipéptido sea capaz de prolongar la semivida del polipéptido *in vivo* e *in vitro*. Algunos ejemplos no limitantes incluyen polietilenglicoles, polivinilpirrolidonas, alcoholes polivinílicos, derivados de celulosa, poliacrilatos, polimetacrilatos, azúcares, polioles y las mezclas de los mismos. Los agentes activos biológicos se pueden conjugar a un polímero farmacéuticamente aceptable para su administración de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Un "vehículo de suministro génico" se define como cualquier molécula que puede portar polinucleótidos insertados en una célula hospedadora. Algunos ejemplos de vehículos de suministro génico son liposomas, polímeros biocompatibles con micelas, incluyendo polímeros naturales y polímeros sintéticos; lipoproteínas; polipéptidos; polisacáridos; lipopolisacáridos; cubiertas virales artificiales; partículas metálicas; y bacterias, o virus, tales como baculovirus, adenovirus y retrovirus, bacteriófago, cósmido, plásmido, vectores fúngicos y otros vehículos de recombinación usados por lo general en la técnica que se han descrito para la expresión en una diversidad de hospedadores eucariotas y procariotas, y que se pueden usar para terapia génica así como para expresión de proteínas sencilla.

Un polinucleótido de la presente divulgación se puede suministrar a una célula o tejido usando un vehículo de suministro génico. "Suministro génico", "transferencia génica", "transducción", y similar, como se usan en el presente documento, son términos que se refieren a la introducción de un polinucleótido exógeno (denominado en ocasiones "transgén") en una célula hospedadora, independientemente del método usado para introducción. Tales métodos incluyen una diversidad de técnicas bien conocidas tales como transferencia génica mediada por vector (mediante, por ejemplo, infección/transfección viral, o diversos otros complejos de suministro génico basados en proteínas o basados en lípidos) así como técnicas que facilitan el suministro de polinucleótidos "desnudos" (tales como electroporación, suministro con "pistola génica" y diversas otras técnicas usadas para la introducción de polinucleótidos). El polinucleótido introducido se puede mantener de forma estable o transitoria en la célula hospedadora. El mantenimiento estable requiere por lo general que el polinucleótido introducido contenga un origen de replicación compatible con la célula hospedadora o se integre en un replicón de la célula hospedadora tal como un replicón extracromosómico (por ejemplo, un plásmido) o un cromosoma nuclear o mitocondrial. Se conoce que una diversidad de vectores es capaz de mediar la transferencia de genes a células de mamíferos, como se conoce en la técnica y se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "ADNe" se refiere a ADN extracelular encontrado como componente de las biopelículas patógenas.

Un "plásmido" es una molécula de ADN extracromosómico separado del ADN cromosómico que es capaz de replicarse independientemente del ADN cromosómico. En numerosos casos, es circular y bicatenario. Los plásmidos proporcionan un mecanismo para la transferencia génica horizontal en una población de microbios y por lo general proporcionan una ventaja selectiva en un estado ambiental dado. Los plásmidos pueden portar genes que proporcionan resistencia a antibióticos de origen natural en un nicho ambiental competitivo, o alternativamente las proteínas producidas pueden actuar como toxinas en circunstancias similares.

Los "plásmidos" usados en ingeniería genética se denominan "vectores de plásmido". Numerosos plásmidos están disponibles en el mercado para tales usos. El gen que se replica se inserta en copias de un plásmido que contiene genes que hacen a las células resistentes a antibióticos particulares y un sitio de clonación múltiple (MCS, o policonector), que es una región corta que contiene varios sitios de restricción usados habitualmente que permiten la inserción fácil de los fragmentos de ADN en esta ubicación. Otro uso principal de los plásmidos es preparar grandes cantidades de proteínas. En este caso, los investigadores cultivan bacterias que contienen un plásmido que alberga el gen de interés. Justo cuando la bacteria produce proteínas para conferir su resistencia a antibióticos, también se

puede inducir que produzca grandes cantidades de proteínas a partir del gen insertado. Esta es una forma barata y fácil de producción en masa de un gen o la proteína que codifica.

Un "cromosoma artificial de levadura" o "YAC" se refiere a un vector usado para clonar grandes fragmentos de ADN (mayor de 100 kb y hasta 3000 kb). Es un cromosoma construido artificialmente y contiene las secuencias telomérica, centromérica, y de origen de replicación necesarias para la replicación y conservación en células de levadura. Construidos usando un plásmido circular inicial, se convierten en lineales usando enzimas de restricción, y a continuación la ADN ligasa puede añadir 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, Yip (plásmido integrador de levadura), y YEp (plásmido episomal de levadura) son extremadamente útiles ya que se pueden obtener productos de proteínas eucariotas con modificaciones postraduccionales, ya que las levaduras son en sí mismas células eucariotas aunque, sin embargo, se ha descubierto que los YAC son más inestables que los BAC, produciendo efectos quiméricos.

Un "vector viral" se refiere como un virus o partícula viral producido de forma recombinante que comprende un polinucleótido que se suministra a una célula hospedadora, ya sea *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Algunos ejemplos de vectores virales incluyen vectores retrovirales, vectores de adenovirus, vectores de virus asociados a adenovirus, vectores de alfavirus y similares. Se pueden usar vectores basados en el virus infeccioso del mosaico del tabaco (TMV) 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 alfa virus, tales como los vectores basados en el virus de Semliki Forest y los vectores basados en el virus Sindbis, también se han desarrollado para su uso en terapia génica e inmunoterapia. Véanse Schlesinger & Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5:434-439 y Ying *et al.* (1999) Nat. Med. 5(7):823-827. En aspectos en los que la transferencia génica esta mediada por un vector retroviral, un constructo de vector se refiere al polinucleótido que comprende el genoma retroviral o parte del mismo, y a un gen terapéutico.

Como se usa en el presente documento, "transferencia génica mediada por retroviral" o "transducción retroviral" tienen el mismo significado y se refieren al proceso mediante el que uno gen o secuencias de ácidos nucleicos se transfieren de forma estable a una célula hospedadora en virtud de los virus que entran en la célula e integran su genoma en el genoma de la célula hospedadora. El virus puede entrar en la célula hospedadora a través de su mecanismo normal de infección o se puede modificar para que se una a un receptor o ligando superficial de célula hospedadora diferente para entrar en la célula. Como se usa en el presente documento, 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 portan su información genética en forma de ARN; sin embargo, una vez el virus infecta una célula, el ARN se transcribe de forma inversa a la forma de ADN que integra en el ADN genómico de la célula infectada. La forma de ADN integrada se denomina un provirus.

En aspectos en los que la transferencia génica esta mediada por un vector viral de ADN, tal como un adenovirus (Ad) o un virus asociado a adenovirus (AAV), un constructo de vector se refiere al polinucleótido que comprende el genoma viral o una parte del mismo, y un transgén. Los adenovirus (Ad) son un grupo homogéneo relativamente bien caracterizado de virus, que incluyen más de 50 serotipos. Véase, por ejemplo, el documento de Solicitud PCT Internacional n.º WO 95/27071. Los Ad no requieren la integración en el genoma de la célula hospedadora. También se han construido vectores derivados de Ad recombinante, en particular los que reducen el potencial de recombinación y generación de virus de tipo natural. Véanse, los documentos de Solicitud PCT Internacional con números WO 95/00655 y WO 95/11984. AAV de tipo natural tiene una alta infectividad y especificidad de integración en el genoma de la célula hospedadora. Véanse Hermonat & Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470 y Lebkowski *et al.* (1988) Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996.

Los vectores que contienen tanto un promotor como un sitio de clonación en el que se puede unir de forma operativa un polinucleótido se conocen bien en la técnica. Tales vectores son capaces de transcribir ARN *in vitro* o *in vivo*, y están disponibles en el mercado en 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 retirar, añadir o alterar partes sin traducir 5' y/o 3' de los clones para eliminar codones de iniciación de traducción alternativos inapropiados potenciales extraordinarios u otras secuencias que puedan interferir con o reducir la expresión, a nivel de transcripción o traducción. Alternativamente, se pueden insertar sitios de unión de ribosoma de consenso inmediatamente 5' del codón de inicio para mejorar la expresión.

Los vehículos de suministro génico también incluyen complejos ADN/liposomas, micelas y complejos proteína viral-ADN de fijación de diana. Se pueden usar en los métodos de la presente divulgación liposomas que también comprenden un anticuerpo de fijación de diana o un fragmento del mismo. Además del suministro de polinucleótidos a una célula o población de células, otras técnicas no limitantes son la introducción directa de las proteínas descritas en el presente documento en la célula o la población de células se puede realizar mediante la técnica no limitante de transfección de proteínas, alternativamente en condiciones de cultivo que puedan mejorar la expresión y/o estimular la actividad de las proteínas de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, los términos "anticuerpo", "anticuerpos" e "inmunoglobulina" incluyen anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno o una cadena individual de los mismos. De ese modo, el término "anticuerpo" incluye cualquier molécula que contiene proteínas o péptidos que comprende al menos una parte de una molécula de inmunoglobulina. Los términos "anticuerpo", "anticuerpos" e "inmunoglobulina" también incluyen inmunoglobulinas de cualquier isotipo, fragmentos de anticuerpos que retienen la unión específica a antígeno que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂, Fv, scFv, dsFv, Fd, dominios dAb, VH, VL, VhH, y V-NAR; minianticuerpos, dianticuerpos, trianticuerpos, tetraanticuerpos y cuerpos kappa; fragmentos de anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos y uno o más aislados. Algunos ejemplos de los mismos incluyen, pero no se limitan a, una región determinante de la complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una parte de unión a ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región de marco (FR), o cualquier parte de la misma, al menos una parte de una proteína de unión, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena individual, y proteínas de fusión que comprenden una parte de unión a antígeno de un anticuerpo y una proteína no anticuerpo. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ab) pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos hospedadores. El término "anti-" cuando se usa antes de un nombre de proteína, anti-IHF, anti-HU, anti-OMP P5, por ejemplo, se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal que se une a y/o tiene una afinidad por una proteína particular. Por ejemplo, "anti-IHF" se refiere a un anticuerpo que se une a la proteína IHF. El anticuerpo específico puede tener afinidad o unirse a proteínas distintas de la proteína frente a la que se cultiva. Por ejemplo, anti-IHF, aunque se cultiva específicamente frente a la proteína IHF, también se puede unir a otras proteínas que están relacionadas a través de homología de secuencia o a través de homología de estructura.

Los anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales, multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos diespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. Los anticuerpos se pueden aislar de cualquier fuente biológica adecuada, por ejemplo, murina, rata, oveja y canina.

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos básicamente homogénea. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dado que cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un determinante individual en el antígeno. Los anticuerpos se pueden marcar de forma detectable, por ejemplo, con un radioisótopo, una enzima que genere un producto detectable, una proteína fluorescente, y similares. Además, los anticuerpos se pueden conjugar a otros restos, tales como miembros de parejas de unión específicas, por ejemplo, biotina (miembro de la pareja de unión específica biotina-avidina), y similares. Los anticuerpos también se pueden unir a un soporte sólido que incluye, pero no se limita a, placas y perlas de poliestireno, y similares. Los anticuerpos monoclonales se pueden generar usando técnicas de hibridoma o métodos de ADN recombinante conocidos en la técnica. Un hibridoma es una célula que se produce en el laboratorio a partir de la fusión de un linfocito productor de anticuerpos y una célula cancerosa no productora de anticuerpos, habitualmente un mieloma o linfoma. Un hibridoma prolifera y produce un ciclo continuo de un anticuerpo monoclonal específico. Las técnicas alternativas para generar o seleccionar anticuerpos incluyen exposición *in vitro* de linfocitos a antígenos de interés, y análisis sistemático de librerías de presentación de anticuerpos en células, fagos, o sistemas similares.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes obtenidas a partir de secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR obtenidas a partir de la línea germinal de otra especie de mamíferos, tal como un ratón, en secuencias de marco humanas. De ese modo, como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que básicamente cada parte de la proteína (por ejemplo, CDR, marco, dominios C_L, C_H (por ejemplo, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}), bisagra, (VL, VH)) es básicamente no inmunogénica en seres humanos, solo con cambios o variaciones de secuencia minoritarios. Del mismo modo, los anticuerpos denominados primate (mono, babuino, chimpancé, etc.), roedor (ratón, rata, conejo, conejillo de indias, hámster, etc.) y otros mamíferos denominan tales anticuerpos específicos de especie, subgénero, género, subfamilia, familia. Además, los anticuerpos quiméricos incluyen cualquier combinación de los anteriores. Tales cambios o variaciones opcionalmente y preferentemente retienen o reducen la inmunogenicidad en humanos u otras especies en relación con los anticuerpos no modificados. De ese modo, un anticuerpo humano es distinto de un anticuerpo quimérico o humanizado. Se señala que un anticuerpo humano se puede producir por un animal no humano o una célula eucariótica o procariota que sea capaz de expresar genes de inmunoglobulina humana reorganizados funcionalmente (por ejemplo, cadena pesada y/o cadena ligera). Además, cuando un anticuerpo humano es un anticuerpo de cadena única, puede comprender un péptido conector que no se encuentra en los anticuerpos humanos nativos. Por ejemplo, un Fv puede comprender un péptido conector, tal como de dos a aproximadamente ocho restos de glicina u otros restos de aminoácido, que conecta la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Dichos péptidos conectores se considera que son de origen humano.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano se "obtiene a partir de" una secuencia de línea germinal particular si el anticuerpo se obtiene a partir de un sistema que usa secuencias de inmunoglobulina humanas, por ejemplo, por inmunización de un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana o por análisis sistemático de una librería de genes de inmunoglobulinas humanas. Un anticuerpo humano que se "obtiene a partir de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana se puede identificar como tal por comparación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con respecto a la secuencia de aminoácidos de las inmunoglobulinas de línea germinal humana. Un anticuerpo humano seleccionado es por lo general al menos un 90 % idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene restos de aminoácidos que identifican que el anticuerpo humano es humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos un 95 %, o incluso al menos un 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Por lo general, un anticuerpo humano obtenido a partir de una secuencia de línea germinal humana particular presentará no más de 10 aminoácidos diferentes de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede presentar una diferencia de no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Un "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una especificidad de unión individual que pueden tener regiones variables y constantes obtenidas a partir de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. El término también indica anticuerpos humanos recombinantes. En el presente documento se describen métodos para preparar estos anticuerpos.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcrómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo, anticuerpos aislados a partir de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, a partir de un transfectoma, anticuerpos aislados a partir de una librería de anticuerpos humana combinatoria recombinante, y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes obtenidas a partir de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Sin embargo, en ciertas realizaciones, tales anticuerpos recombinantes humanos se pueden someter a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y de ese modo la secuencia de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque obtenidas a partir de y relacionadas con las secuencias de VH y VL de línea germinal humana, pueden no existir de forma natural en el repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*. En el presente documento se describen métodos para preparar estos anticuerpos.

Como se usa en el presente documento, anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido por lo general 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, la expresión "anticuerpo humanizado" o "inmunoglobulina humanizada" se refiere a un anticuerpo quimérico humano/no humano que contiene una secuencia mínima obtenida a partir de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) en las que se reemplazan restos de una región variable del receptor por restos de una región variable de una especie no humana (anticuerpo del donante) tal como ratón, rata, conejo, o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. Los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo del receptor o en el anticuerpo del donante. El anticuerpo humanizado también puede comprender opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), por lo general la de una inmunoglobulina humana, un anticuerpo no humano que contiene uno o más aminoácidos en una región de marco, una región constante o una CDR, que se han sustituido con un aminoácido situado de forma correspondiente de un anticuerpo humano. En general, se espera que los anticuerpos humanizados produzcan una respuesta inmune reducida en un hospedador humano, en comparación con una versión no humanizada del mismo anticuerpo. Los anticuerpos humanizados pueden tener sustituciones de aminoácidos conservativas que no tienen básicamente ningún efecto en la unión a antígeno u otras funciones del anticuerpo. Las agrupaciones de sustituciones conservativas incluyen: glicina-alanina, valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, serina-treonina y asparagina-glutamina.

Las expresiones "anticuerpo policlonal" o "composición de anticuerpo policlonal", como se usan en el presente documento, se refieren a la preparación de anticuerpos que se obtienen a partir de diferentes líneas de linfocitos B. Son una mezcla de moléculas de inmunoglobulina segregadas frente a un antígeno específico, que reconocen cada una un epítipo diferente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "derivado de anticuerpo" comprende un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de un anticuerpo, en el que uno o más de los aminoácidos están modificados químicamente por alquilación, pegilación, acilación, formación de éster o formación de amida o similar, por ejemplo, por unión del anticuerpo a una segunda molécula. Esto incluye, pero no se limita a, anticuerpos pegilados, anticuerpos pegilados-cisteína, y variantes de los mismos.

Como se usa en el presente documento, el término "marcador" indica un compuesto o composición detectable directa o indirectamente que está conjugado directa o indirectamente a la composición que se detecta, por ejemplo, etiquetas de histidina en N-terminal (N-His), isótopos magnéticamente activos, por ejemplo ^{115}Sn , ^{117}Sn y ^{119}Sn , isótopos no radiactivos tales como ^{13}C y ^{15}N , polinucleótidos o proteínas tales como un anticuerpo para generar una composición "marcada". El término también incluye secuencias conjugadas al polinucleótido que proporcionarán una señal tras la expresión de las secuencias insertadas, tales como proteína fluorescente verde (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 sea detectable. Los marcadores pueden ser adecuados para detección a pequeña escala o más adecuados para análisis sistemático de alto rendimiento. Como tales, los marcadores adecuados incluyen, pero no se limitan a isótopos magnéticamente activos, isótopos no radiactivos, radioisótopos, fluorocromos, compuestos quimioluminiscentes, colorantes, y proteínas, incluyendo enzimas. El marcador se puede detectar simplemente o se puede cuantificar. Una respuesta que se detecta simplemente comprende por lo general una respuesta cuya existencia se confirma meramente, mientras que una respuesta que se cuantifica comprende por lo general una respuesta que tiene un valor cuantificable (es decir, numéricamente informable) tal como una intensidad, polarización, y/u otra propiedad. En ensayos de luminiscencia o fluorescencia, la respuesta detectable se puede generar directamente usando un luminóforo o fluoróforo asociado a un componente de ensayo implicado realmente en la unión, o usando indirectamente un luminóforo o fluoróforo asociado a otro componente (por ejemplo, informador o indicador). Algunos ejemplos de marcadores luminiscentes que producen señales incluyen, pero no se limitan a bioluminiscencia y quimioluminiscencia. La respuesta de luminiscencia detectable comprende por lo general un cambio en, o la aparición de, una señal de luminiscencia. Se conocen métodos y luminóforos adecuados para el marcaje de forma luminiscente de componentes de ensayo y se describen, por ejemplo, en Haugland, Richard P. (1996) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (6ª ed.). Algunos ejemplos de sondas luminiscentes incluyen, pero no se limitan a, aequorina y luciferasas.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoconjugado" comprende un anticuerpo o un derivado de anticuerpo asociado o unido a un segundo agente, tal como un agente citotóxico, un agente detectable, un agente radioactivo, un agente de fijación de diana, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo sintético, un anticuerpo semisintético, o un anticuerpo multispecífico.

Algunos ejemplos de marcadores fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde Malaquita, estilbeno, Amarillo Lucifer, Azul Cascade™ y Rojo Texas. Se describen otros colorantes ópticos adecuados en Haugland, Richard P. (1996) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (6ª ed.).

En otro aspecto, el marcador fluorescente está funcionalizado 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. Los grupos funcionales adecuados, que incluyen, pero no se limitan a, grupos isotiocianato, grupos amino, grupos haloacetilo, maleimidas, ésteres de succinimidilo, y haluros de sulfonilo, todos los cuales se pueden usar para unir el marcador fluorescente a una segunda molécula. La elección del grupo funcional del marcador fluorescente dependerá del sitio de unión a un conector, el agente, el marcador, o el segundo agente de marcaje.

Las "células eucariotas" comprenden todos los reinos de vida excepto monera. Se pueden distinguir fácilmente a través de un núcleo unido a la membrana. Los animales, plantas, hongos y protistas son eucariotas u organismos cuyas células se organizan en estructuras complejas mediante membranas internas y un citoesqueleto. La estructura unida a la membrana más característica es el núcleo. A menos que se mencione específicamente, el término "hospedador" incluye un hospedador eucariota, que incluye, por ejemplo, células de levadura, plantas superiores, insectos y mamíferos. Los ejemplos no limitantes de células eucariotas o huéspedes incluyen simios, bovinos, porcinos, murinos, ratas, aves, reptiles y humanos.

Las "células procariotas" que habitualmente carecen de un núcleo o cualquier otro orgánulo unido a la membrana se dividen en dos dominios, bacterias y arqueas. Además del ADN cromosómico, estas células también pueden contener información genética en un bucle circular llamado episoma. Las células bacterianas son muy pequeñas, aproximadamente del tamaño de una mitocondria animal (aproximadamente de 1 a 2 μm de diámetro y 10 μm de longitud). Las células procariotas presentan tres formas principales: forma de varilla, esférica y espiral. En lugar de pasar por procesos de replicación elaborados como las eucariotas, las células bacterianas se dividen por fisión binaria. Algunos ejemplos incluyen pero no se limitan a las bacterias *Bacillus*, la bacteria *E. coli* y la bacteria *Salmonella*.

Un antígeno "nativo" o "natural" es un polipéptido, proteína o fragmento que contiene un epítipo, que se ha aislado de una fuente biológica natural, y que se puede unir específicamente a un receptor de antígeno, en particular un receptor de antígeno de linfocito 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, actúan como un miembro de un par anticuerpo-ligando. "Unión específica" se refiere a la interacción de un antígeno con las regiones variables de cadenas pesada y ligera de una inmunoglobulina. La unión anticuerpo-antígeno puede producirse *in vivo* o *in vitro*. El experto en la materia entenderá que las macromoléculas, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos, ácidos grasos, lípidos, lipopolisacáridos y polisacáridos tienen el potencial de actuar como un antígeno. El experto en la materia entenderá además que los ácidos nucleicos que codifican una proteína con el potencial de actuar como un ligando de anticuerpo codifican necesariamente un antígeno. El experto en la materia entenderá 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 de adjetivo a moléculas que tienen las propiedades de un antígeno. El término abarca sustancias que son inmunogénicas, es decir, inmunógenos, así como sustancias que inducen una falta de respuesta inmunológica, o anergia, es decir, anérgenos.

Un "antígeno alterado" es el que tiene una secuencia primaria que es diferente de la del antígeno de tipo natural correspondiente. Los antígenos alterados pueden prepararse por métodos sintéticos o recombinantes e incluyen, pero no se limitan a, péptidos antigénicos que se modifican diferencialmente durante o después de la traducción, por ejemplo, por fosforilación, glicosilación, reticulación, acilación, escisión proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo, molécula de membrana u otro ligando (Ferguson *et al.* (1988) Ann. Rev. Biochem. 57:285-320). Un antígeno sintético o alterado de la divulgación está destinado a unirse al mismo TCR que el epítipo natural.

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

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

La expresión "matriz presentadora de antígeno", como se usa en el presente documento, indica una molécula o moléculas que pueden presentar un antígeno de un modo tal que el antígeno pueda estar unido por un receptor de antígeno de linfocito T sobre la superficie de un linfocito T. Una matriz presentadora de antígeno puede estar en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC), en una preparación de vesícula de una APC, o puede estar en forma de una matriz sintética sobre un soporte sólido tal como una perla o una placa. Un ejemplo de una matriz presentadora de antígeno sintética es moléculas de clase I de MHC purificadas formando un complejo con β 2-microglobulina, multímeros de tales moléculas de clase I de MHC purificadas, moléculas de Clase II de MHC purificadas, o partes funcionales de las mismas, unidas a un soporte sólido.

La expresión "células presentadoras de antígeno (APC)" se refiere a una clase de células capaces de presentar uno o más antígenos en la forma de complejo antígeno-MHC reconocible por las células efectoras específicas del sistema inmunitario, y de ese modo inducir una respuesta inmune celular eficaz frente al antígeno o antígenos que se presentan. Aunque muchos tipos de células pueden ser capaces de presentar antígenos en su superficie celular para el reconocimiento de linfocitos T, solo las APC profesionales tienen la capacidad de presentar antígenos en una cantidad eficaz y además activar los linfocitos T para las respuestas de los linfocitos T citotóxicos (CTL). Las APC pueden ser células completas intactas tales como macrófagos, linfocitos B y células dendríticas; u otras moléculas, de origen natural o sintéticas, tales como moléculas de clase I del MHC purificadas formando un complejo con β 2-microglobulina.

La expresión "células dendríticas (CD)" se refiere a una población diversa de tipos de células morfológicamente similares que se encuentran en una variedad de tejidos linfoides y no linfoides (Steinman (1991) Ann. Rev. Immunol. 9:271-296). Las células dendríticas constituyen las APC de mamíferos más potentes y preferentes. Un subconjunto,

si no todos, de las CD se obtienen a partir de células progenitoras de la médula ósea, circulan en pequeñas cantidades en la sangre periférica y aparecen como células de Langerhans inmaduras o células maduras diferenciadas terminalmente. Aunque las CD pueden obtenerse a partir de monocitos, poseen fenotipos distintos. Por ejemplo, un marcador de diferenciación particular, el antígeno CD14, no se encuentra en las células dendríticas, pero se expresa en monocitos a niveles muy altos mediante los monocitos. Véase, por ejemplo, Jersmann *et al.*, (2005) *Immunol. Cell Biol.* 83:462. Además, las células dendríticas maduras no son fagocíticas, mientras que los monocitos son células fuertemente fagocíticas. Los monocitos maduros y las CD realizan el endocitosis del material a través de diferentes mecanismos. Los monocitos engullen por medio de la fagocitosis, mientras que las CD utilizan macropinocitosis. De ese modo, las CD engullen por lo general carga de un tamaño más pequeño que los monocitos (véase, por ejemplo, Conner y Schmid, (2003) *Nature* 433:37-44). Se ha demostrado que las CD son tan endocíticamente activas como otras células presentadoras de antígeno, y proporcionan todas las señales necesarias para la activación y proliferación de linfocitos T (véase, por ejemplo, Levine y Chain, (1992) *ONAS* 89 (17):8342.

La expresión "factores de reclutamiento de células presentadoras de antígeno" o "factores de reclutamiento de APC" incluye tanto células completas intactas como otras moléculas que son capaces de reclutar células presentadoras de antígeno. Algunos ejemplos de factores de reclutamiento de APC adecuados incluyen moléculas tales como interleuquina 4 (IL4), factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), Sepragel y proteína 3 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP3a). Estos están disponibles en Immunex, Schering-Plough y R&D Systems (Minneapolis, Minn.). También se pueden producir de forma recombinante usando los métodos descritos en *Current Protocols In Molecular Biology* (F. M. Ausubel *et al.*, eds. (1987)). Los péptidos, proteínas y compuestos que tienen la misma actividad biológica que los factores indicados anteriormente se incluyen dentro del ámbito de la presente divulgación.

La expresión "células efectoras inmunes" se refiere a células capaces de unirse a un antígeno y que median una respuesta inmune. Estas células incluyen, pero no se limitan a, linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, células NK y linfocitos T citotóxicos (CTL), por ejemplo líneas de CTL, clones de CTL y los CTL de tumores, inflamatorios u otros infiltrados. Ciertos tejidos enfermos expresan antígenos específicos y se han identificado CTL específicos para estos antígenos.

La expresión "molécula efectora inmune", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas capaces de unión específica a antígeno, e incluyen anticuerpos, receptores de antígeno de linfocitos T, receptores de antígeno de linfocitos B y moléculas de Clase I y Clase II de MHC.

Una célula efectora inmune "no comprometida" es una célula efectora inmune que nunca se ha expuesto a un antígeno capaz de activar esa célula. La activación de los linfocitos T efectores inmunes no comprometidos requiere tanto el reconocimiento del complejo antígeno:MHC como el suministro simultáneo de una señal coestimuladora por parte de una APC profesional con el fin de proliferar y diferenciarse en linfocitos T efectores armados específicos de antígeno. Los linfocitos T activados pueden activar linfocitos B específicos a través de sinapsis inmunológicas al proporcionar una señal de coestimulación. Los linfocitos B activados producen posteriormente anticuerpos dirigidos a un antígeno específico. Los linfocitos B no comprometidos también se pueden activar por mecanismos independientes de linfocitos T. Esto se produce cuando los antígenos son capaces de unirse al receptor de linfocitos B y producir una señal de coestimulación.

"Respuesta inmune" se refiere ampliamente a las respuestas específicas de antígeno de los linfocitos frente a sustancias extrañas. Los términos "inmunógeno" e "immunogénico" se refieren a moléculas con la capacidad de provocar una respuesta inmune. Todos los inmunógenos son antígenos aunque, sin embargo, no todos los antígenos son inmunogénicos. Una respuesta inmune de la presente divulgación puede ser humoral (mediante la actividad de anticuerpos) o mediada por células (mediante la activación de linfocitos T). La respuesta se puede producir *in vivo* o *in vitro*. El experto en la materia entenderá que una diversidad de macromoléculas, que incluyen proteínas, ácidos nucleicos, ácidos grasos, lípidos, lipopolisacáridos y polisacáridos tienen el potencial de ser inmunogénicos. El experto en la materia también entenderá que los ácidos nucleicos que codifican una molécula capaz de provocar una respuesta inmune codifican necesariamente un inmunógeno. El experto en la materia también entenderá 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 se puede producir de forma natural, como cuando los anticuerpos maternos se transfieren a un feto. La inmunidad pasiva también se puede producir de forma artificial, como cuando se administran composiciones de anticuerpos a sujetos no inmunes. Los donantes y receptores de anticuerpos pueden ser sujetos humanos o no humanos. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, se pueden generar *in vitro* o *in vivo*, y pueden estar purificados, parcialmente purificados, o sin purificar, dependiendo de la realización. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, se otorga inmunidad pasiva a un sujeto con necesidad de la misma mediante la administración de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que reconocen o se unen específicamente a un antígeno particular. En algunas realizaciones, se confiere inmunidad pasiva mediante la administración de un polinucleótido recombinante o aislado que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que reconoce o se une específicamente a un antígeno particular.

En el contexto de la presente divulgación, 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 de la proteína el que se combina directamente con el sitio de unión complementario en la célula efectora inmune.

En un aspecto, un péptido o ligando de la divulgación se une a un determinante antigénico o epítipo en una célula efectora inmune, tal como un anticuerpo o un receptor de linfocito T (TCR). Un ligando puede ser un antígeno, péptido, proteína o epítipo de la divulgación.

En otro aspecto, los ligandos se pueden unir a un receptor en un anticuerpo. En una realización, el ligando de la divulgación tiene de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 aminoácidos de longitud.

En un aspecto adicional, los ligandos se pueden unir a un receptor en una molécula de clase I de MHC. En una realización, el ligando de la divulgación tiene de aproximadamente 7 a aproximadamente 11 aminoácidos de longitud.

En otro aspecto adicional, los ligandos se pueden unir a un receptor en una molécula de clase II de MHC. En una realización, el ligando de la divulgación tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos de longitud.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula efectora inmune específica de antígeno educada" es una célula efectora inmune como se ha definido anteriormente, que se ha encontrado previamente con un antígeno. A diferencia de su contrapartida no comprometida, la activación de una célula efectora inmune específica de antígeno educada no requiere una señal de coestimulación. Es suficiente el reconocimiento del complejo péptido:MHC.

"Activado", cuando se usa por referencia a un linfocito T, implica que la célula ya no está más en fase G₀, y comienza a producir una o más citotoxinas, citoquinas, y otras proteínas asociadas a membrana relacionadas características del tipo de célula (por ejemplo, CD8⁺ o CD4⁺), y es capaz de reconocer y unirse a cualquier célula diana que presente el antígeno particular sobre su superficie, y liberar sus moléculas efectoras.

La expresión "reactividad cruzada" se usa para describir los compuestos de la divulgación que se superponen funcionalmente. Más particularmente, las propiedades inmunogénicas de un ligando nativo y/o células efectoras inmunes activadas de ese modo se comparten en cierta medida por parte del ligando alterado de un modo tal que el ligando alterado presenta "reactividad cruzada" con el ligando nativo y/o las células efectoras inmunes activadas de ese modo. Para los fines de la presente divulgación, la reactividad cruzada se manifiesta a múltiples niveles: (i) a nivel de ligando, por ejemplo, los ligandos alterados se pueden unir al TCR de un CTL de ligando nativo activado; (ii) a nivel de linfocitos T, es decir, los ligandos alterados de la divulgación se pueden unir al TCR de y activar una población de linfocitos T (distinta de la población de los CTL de ligando nativo) que pueden fijar como diana y lisar de forma eficaz células que presentan el ligando nativo; y (iii) a nivel de anticuerpo, por ejemplo, los anticuerpos "anti"-ligando alterado pueden detectar, reconocer y unirse al ligando nativo e iniciar mecanismos efectores en una respuesta inmune que finalmente da como resultado la eliminación del ligando nativo del hospedador.

Como se usa en el presente documento, la expresión "inducir una respuesta inmune en un sujeto" es una expresión que se conoce bien en la técnica e indica que se puede detectar o medir un aumento de al menos aproximadamente 2 veces, más preferentemente al menos aproximadamente 5 veces, más preferentemente al menos aproximadamente 10 veces, más preferentemente al menos aproximadamente 100 veces, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 500 veces, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 1000 veces o más en una respuesta inmune a un antígeno (o epítipo), después de introducir el antígeno (o epítipo) en el sujeto, con respecto a la respuesta inmune (si la hubiera) antes de la introducción del antígeno (o epítipo) en el sujeto. Una respuesta inmune a un antígeno (o epítipo) incluye, pero no se limita a, la producción de un anticuerpo específico de antígeno (o específico de epítipo), y la producción de una célula inmunitaria que expresa sobre su superficie una molécula que se une específicamente a un antígeno (o epítipo). Los métodos de determinación de si se ha inducido una respuesta inmune a un antígeno (o epítipo) dado se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede detectar un anticuerpo específico de antígeno usando cualquiera de una diversidad de inmunoensayos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, ELISA en el que, por ejemplo, la unión de un anticuerpo de una muestra a un antígeno (o epítipo) inmovilizado se detecta con un anticuerpo secundario marcado de forma detectable (por ejemplo, un anticuerpo de Ig anti-humana de ratón marcado con una enzima).

Las "moléculas coestimuladoras" están implicadas en la interacción entre los pares receptor-ligando expresados en la superficie de las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T. La investigación acumulada en los últimos años ha demostrado convincentemente que los linfocitos T en reposo requieren al menos dos señales para la inducción de la expresión génica y proliferación de citoquinas (Schwartz (1990) Science 248:1349-1356 y Jenkins (1992) Immunol. Today 13:69-73). Una señal, la que confiere especificidad, se puede producir por interacción del

complejo TCR/CD3 con un complejo MHC/péptido apropiado. La segunda señal no es específica de antígeno y se denomina señal "coestimuladora". Esta señal se definió originalmente como una actividad proporcionada por células accesorias obtenidas de la médula ósea tales como macrófagos y células dendríticas, las denominadas APC "profesionales". Se ha mostrado que varias moléculas potencian la actividad coestimuladora. Estas son el antígeno estable frente al calor (HSA) (Liu *et al.* (1992) J. Exp. Med. 175:437-445), la cadena invariante de MHC modificada con sulfato de condroitina (li-CS) (Naujokas *et al.* (1993) Cell 74:257-268), la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) (Van (1992) Cell 71:1065-10). Estas moléculas se producen cada una para ayudar a la coestimulación por interacción con sus ligandos cognados en los linfocitos T. Las moléculas coestimuladoras median la señal o señales coestimuladoras, que son necesarias, en condiciones fisiológicas normales, para conseguir la activación completa de los linfocitos T no comprometidos. Un par receptor-ligando a modo de ejemplo es la molécula coestimuladora B7 de la superficie de las APC y su contrarreceptor CD28 o CTLA-4 en linfocitos T (Freeman *et al.* (1993) Science 262:909-911; Young *et al.* (1992) J. Clin. Invest. 90:229 y Nabavi *et al.* (1992) Nature 360:266-268). Otras moléculas coestimuladoras importantes son CD40, CD54, CD80, y CD86. La expresión "molécula coestimuladora" incluye cualquier molécula individual o combinación de moléculas que, cuando actúan junto con un complejo péptido/MHC unido por un TCR sobre la superficie de un linfocito T, proporciona un efecto coestimulador que consigue la activación del linfocito T que está unido al péptido. El término incluye de ese modo B7, u otra molécula o moléculas coestimuladoras sobre una matriz presentadora de antígeno tal como una APC, fragmentos de la misma (solos, formando un complejo con otra molécula o moléculas, o como parte de una proteína de fusión) que, junto con el complejo péptido/MHC, se une a un ligando cognado y da como resultado la activación del linfocito T cuando el TCR sobre la superficie del linfocito T se une específicamente al péptido. Las moléculas coestimuladoras están disponibles en el mercado en una diversidad de fuentes que incluyen, por ejemplo, Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, Calif.). Se pretende, aunque no siempre se indica explícitamente, que las moléculas que tienen actividad biológica similar a moléculas de tipo natural o coestimuladoras purificadas (por ejemplo, producidas de forma recombinante o muteínas de las mismas) se pretende que se usen dentro del ámbito de la divulgación.

Como se usa en el presente documento, un "soporte de fase sólida" o "soporte sólido", usado de forma intercambiable, no se limita a un tipo específico de soporte. En su lugar, está disponible, y el experto habitual en el en la materia conoce, un gran número de soportes. Los soportes de fase sólida incluyen geles de sílice, resinas, películas de plástico derivatizadas, perlas de vidrio, algodón, perlas de plástico, geles de alúmina. Como se usa en el presente documento, un "soporte sólido" también incluye matrices presentadoras de antígeno sintéticas, células, y liposomas. Un soporte de fase sólida adecuado se puede seleccionar basándose en el uso final deseado y la idoneidad para diversos protocolos. Por ejemplo, para síntesis de péptidos, el soporte de fase sólida puede referirse a resinas tales como poliestireno (por ejemplo, PAM-resina obtenido en Bachem Inc., Peninsula Laboratories, etc.), resina POLYHIPE.RTM. (obtenida en Aminotech, Canadá), resina de poliamida (obtenida en Peninsula Laboratories), resina de poliestireno injertada con polietilenglicol (TentaGel.RTM., Rapp Polymere, Tubingen, Alemania) o resina de polidimetilacrilamida (obtenida en Milligen/Bioscience, Calif.).

Un ejemplo de un soporte de fase sólida incluye vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble en cierta medida o insoluble. El material de soporte puede tener casi cualquier configuración estructural posible siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un polinucleótido, polipéptido o anticuerpo. De ese modo, la configuración del soporte puede ser esférica, como en una perla, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie exterior de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana tal como una lámina, tira de ensayo, etc., o alternativamente perlas de poliestireno. Los expertos en la materia conocerán muchos otros vehículos adecuados para la unión de anticuerpo o antígeno, o podrán determinar los mismos mediante el uso de experimentación rutinaria.

La expresión "agente inmunomodulador", como se usa en el presente documento, es una molécula, un complejo macromolecular, o una célula que modula una respuesta inmune e incluye un péptido antigénico sintético de la divulgación solo o en cualquiera de una diversidad de formulaciones descritas en el presente documento; un polipéptido que comprende un péptido antigénico sintético de la divulgación; un polinucleótido que codifica un péptido o polipéptido de la divulgación; un péptido antigénico sintético de la divulgación unido a una molécula de MHC de Clase I o Clase II sobre una matriz presentadora de antígeno, incluyendo una APC y una matriz presentadora de antígeno sintética (en presencia o ausencia de una molécula o moléculas coestimuladoras); un péptido antigénico sintético de la divulgación formando un complejo unido covalente o no covalentemente con otra molécula o moléculas o estructura macromolecular; y una célula efectora inmune específica de antígeno educada que es específica para un péptido de la divulgación.

La expresión "modular una respuesta inmune" incluye inducir (aumentar, provocar) una respuesta inmune; y reducir (suprimir) una respuesta inmune. Un método (o protocolo) inmunomodulador es el que modula una respuesta inmune en un sujeto.

Como se usa en el presente documento, el término "citoquina" se refiere a uno cualquiera de los numerosos factores que ejercen una diversidad de efectos en las células, por ejemplo, que inducen crecimiento o proliferación. Algunos ejemplos no limitantes de citoquinas que se pueden usar solas o en combinación en la práctica de la presente divulgación incluyen interleuquina-2 (IL-2), factor de células madre (SCF), interleuquina 3 (IL-3), interleuquina 6 (IL-

6), interleuquina 12 (IL-12), G-CSF, factor estimulador de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), interleuquina-1 alfa (IL-1 α), interleuquina-11 (IL-11), MIP-11, factor inhibidor de leucemia (LIF), ligando c-kit, trombopoyetina (TPO) y ligando flt3. La presente divulgación también incluye condiciones de cultivo en las que una o más citoquinas se excluyen específicamente del medio. Las citoquinas están disponibles en el mercado en diversos vendedores tales como, por ejemplo, Genzyme (Framingham, Mass.), Genentech (South San Francisco, Calif.), Amgen (Thousand Oaks, Calif.), R&D Systems (Minneapolis, Minn.) e Immunex (Seattle, Wash.). Se pretende, aunque no siempre se indica explícitamente, que las moléculas que tienen actividad biológica similar a las citoquinas de tipo natural o purificadas (por ejemplo, producidas de forma recombinante o muteínas de las mismas) se pretende que se usen dentro del ámbito de la divulgación.

Métodos diagnósticos y terapéuticos

Se proporciona un método *in vitro* para inhibir, competir o valorar la unión de un polipéptido o una proteína DNABII a un ADN microbiano, poniendo en contacto el polipéptido o la proteína DNABII o el ADN microbiano con un agente interferente, para inhibir, competir o valorar de ese modo la unión de la proteína o el polipéptido DNABII al ADN microbiano. En un aspecto adicional, el polipéptido DNABII y el ADN microbiano se marcan de forma detectable, por ejemplo con moléculas luminiscentes que emitirán una señal cuando se pongan en contacto cercano entre sí. El contacto se puede llevar a cabo *in vitro* o *in vivo*.

En otro aspecto, se proporciona un método *in vitro* para inhibir, prevenir o descomponer una biopelícula microbiana poniendo en contacto la biopelícula con un agente interferente, para inhibir, prevenir o descomponer de ese modo la biopelícula microbiana. En un aspecto adicional, el polipéptido DNABII y el ADN microbiano se marcan de forma detectable, por ejemplo con moléculas luminiscentes que emitirán una señal cuando se pongan en contacto cercano entre sí. El contacto se puede llevar a cabo *in vitro* o *in vivo*.

Cuando se ponen en práctica *in vitro*, los métodos son útiles para analizar sistemáticamente o confirmar agentes interferentes que tienen una capacidad igual, similar u opuesta a los polipéptidos, polinucleótidos, anticuerpos, células hospedadoras, moléculas pequeñas y composiciones de la presente divulgación. Alternativamente, se pueden usar para identificar el agente interferente que es el más adecuado para tratar una infección microbiana. Por ejemplo, se pueden analizar sistemáticamente nuevos agentes o terapias de combinación teniendo dos muestras que contienen, por ejemplo, el polipéptido DNABII y el ADN microbiano y el agente que se somete a ensayo. La segunda muestra contiene el polipéptido DNABII y el ADN microbiano y un agente conocido por activar, por ejemplo, un anticuerpo anti-IHF o una molécula pequeña que sirve como control positivo. En un aspecto adicional, se proporcionan varias muestras y se añaden los agentes interferentes al sistema en diluciones crecientes para determinar la dosis óptima que probablemente sería eficaz en el tratamiento de un sujeto en el escenario clínico. Como es evidente para el experto en la materia, se puede proporcionar un control negativo que contenga el polipéptido DNABII y el ADN microbiano. En un aspecto adicional, el polipéptido DNABII y el ADN microbiano se marcan de forma detectable, por ejemplo con moléculas luminiscentes que emitirán una señal cuando se pongan en contacto cercano entre sí. Las muestras están contenidas en condiciones similares durante una cantidad de tiempo eficaz para que el agente inhiba, compita o valore la interacción entre el polipéptido DNABII y el ADN microbiano y a continuación la muestra se somete a ensayo para la emisión de señal de las moléculas luminiscentes. Si la muestra emite una señal, entonces el agente no es eficaz para inhibir la unión.

En otro aspecto, el método *in vitro* se pone en práctica en un sistema de portaobjetos con cámara miniaturizado en el que el aislado microbiano (tal como un aislado bacteriano) que causa una infección se podría aislar del ser humano/animal y a continuación cultivarse para permitir que crezca como una biopelícula *in vitro*; véase, por ejemplo, el Experimento n.º 1 posterior. El agente interferente (tal como un anticuerpo anti-IHF) o el agente interferente potencial de la biopelícula se añade solo o en combinación con otro agente al cultivo con o sin diluciones crecientes del agente interferente potencial o el agente interferente tal como un anti-IHF (u otro anticuerpo, molécula pequeña, agente, etc.) para descubrir la dosis óptima que probablemente sería eficaz en el tratamiento de ese paciente cuando se suministra al sujeto en el que existió la infección. Como resulta evidente para el experto en la materia, se puede llevar a cabo simultáneamente un control positivo o negativo.

En un aspecto adicional, el método se pone en práctica en una plataforma de alto rendimiento con el agente interferente (tal como un 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 un anticuerpo anti-IHF) o el agente interferente potencial de la biopelícula se añade solo o en combinación con otro agente al cultivo con o sin diluciones crecientes del agente interferente potencial o el agente interferente tal como un anti-IHF (u otro anticuerpo, molécula pequeña, agente, etc.) para descubrir la dosis óptima que probablemente sería eficaz en el tratamiento de ese paciente cuando se suministra al sujeto en el que existió la infección. Los aislados de biopelículas se someten a ultrasonidos para separar las bacterias de la biopelícula del polipéptido DNABII tal como IHF unido a ADN microbiano. Los complejos polipéptido DNABII-ADN se aíslan en virtud del anticuerpo anti-IHF en la plataforma. El ADN microbiano se libera a continuación, por ejemplo con un lavado de sal, y se usa para identificar las bacterias añadidas de la biopelícula. El ADN liberado se identifica a continuación, por ejemplo, mediante secuenciación por PCR. Si no se libera el ADN, entonces el agente o agentes interferentes funcionaron o se unieron con éxito al ADN microbiano. Si se encuentra ADN en la muestra, entonces el agente no interfirió en la unión polipéptido DNABII-ADN microbiano.

Como resulta evidente para el experto en la materia, se puede llevar a cabo simultáneamente un control positivo y/o negativo.

Los métodos anteriores también se pueden usar como ensayo diagnóstico dado que es posible que una especie bacteriana dada responda mejor que otra a la inversión de su biopelícula mediante un agente, y este sistema de ensayo de alto rendimiento rápido podría permitir al experto en la materia someter a ensayo un panel de posibles agentes de tipo anti-IHF para identificar el más eficaz del grupo. La ventaja de estos métodos es que la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica de los hospitales ya están equipados para llevar a cabo estos tipos de ensayo (es decir, determinación de los valores de MIC, MBC) usando bacterias que crecen en un cultivo líquido (o de forma planctónica). Como es evidente para los expertos en la materia, por lo general las bacterias no crecen de forma planctónica cuando causan enfermedades. En su lugar, crecen en forma de una biopelícula estable y estas biopelículas son considerablemente más resistentes al tratamiento con antibióticos, anticuerpos u otros compuestos terapéuticos. Esta resistencia es la causa por la que la mayoría de los valores de MIC/MBC fracasen al predecir de forma precisa la eficacia *in vivo*. De ese modo, mediante la determinación de la "dosis" de agente que podría revertir una biopelícula bacteriana *in vitro* (como se ha descrito anteriormente), el ensayo preclínico de los Solicitantes sería un indicador más fiable de eficacia clínica, incluso como aplicación para medicina personalizada.

Además del entorno clínico, los métodos se pueden usar para identificar el microbio que causa la infección y/o confirmar agentes interferentes eficaces en un entorno industrial. En un aspecto adicional de los métodos anteriores, un antibiótico o antimicrobiano conocido por inhibir el crecimiento de la infección subyacente se añade de forma secuencial o concurrente para determinar si se puede inhibir la infección. También es posible añadir el agente interferente al ADN microbiano o al polipéptido DNABII antes de añadir el complejo perdido para someter a ensayo la inhibición de la biopelícula.

Cuando se pone en práctica *in vivo* en un animal no humano tal como una chinchilla, el método de la divulgación proporciona un análisis sistemático preclínico para identificar agentes interferentes que se puedan usar solos o en combinación con otros agentes para descomponer biopelículas. Algunos ejemplos de este método se muestran en los Experimentos posteriores con números 2 a 7.

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un agente interferente como se define en las reivindicaciones para su uso en un método de inhibición, prevención o descomposición de una biopelícula en un sujeto por administración al sujeto de una cantidad eficaz del agente interferente, para inhibir, prevenir o descomponer de ese modo la película microbiana. Algunos ejemplos de este método se muestran en los Experimentos posteriores con números 2 a 7.

Para los fines de los métodos de la divulgación *in vitro* e *in vivo* indicados anteriormente, el agente interferente es del grupo de:

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

(b) una proteína de tipo histona aislada o recombinante de un polipéptido de la cepa U93 de *E. coli* (HU) o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(c) una proteína o un polipéptido aislados o recombinantes identificados en la Tabla 8, la Tabla 9A, la Tabla 9B, la Tabla 10 o un péptido de unión a ADN identificado en la Figura 6, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(d) un polipéptido aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 1 a 35, 37 a 340, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(e) un polipéptido C-terminal aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, 42 a 100, la Tabla 8 o los polipéptidos C-terminales identificados en la Tabla 10 o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(f) un polipéptido que compite con un factor de integración del hospedador en la unión a un ADN microbiano;

(g) un polinucleótido de cruce de cuatro vías que se parece a la unión de Holliday, un polinucleótido de cruce de 3 vías que se parece a una horquilla de replicación, un polinucleótido que tiene flexibilidad inherente o un polinucleótido doblado;

(h) un polinucleótido aislado o recombinante que codifica uno cualquiera de (a) a (f) 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 se hibrida en condiciones rigurosas al polinucleótido, su equivalente o su complemento;

(i) un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que reconoce o se une específicamente a uno cualquiera de (a) a (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 el fragmento de unión a antígeno de (i) o su complemento; o

(k) una molécula pequeña que compite por la unión de una proteína o polipéptido DNABII a un ADN microbiano.

En el presente documento tomé se proporciona un método para inducir una respuesta inmune en o conferir inmunidad pasiva a un sujeto con necesidad del mismo, que comprende, o alternativamente consiste básicamente en, o aún más consiste en, administrar al sujeto una cantidad eficaz de uno o más del grupo:

(a) un polipéptido de factor de integración del hospedador (IHF) aislado o recombinante o un fragmento o un

equivalente de cada uno de los mismos;

(b) una proteína de tipo histona aislada o recombinante de un polipéptido de la cepa U93 de *E. coli* (HU) o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(c) una proteína o un polipéptido aislados o recombinantes identificados en la Tabla 8, la Tabla 9A, la Tabla 9B, la Tabla 10 o un péptido de unión a ADN identificado en la Figura 6, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(d) un polipéptido aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 1 a 35, 37 a 340, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(e) un polipéptido C-terminal aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, 42 a 100, la Tabla 8 o los polipéptidos C-terminales identificados en la Tabla 10 o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(f) un polinucleótido aislado o recombinante que codifica uno cualquiera de (a) a (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 se hibrida en condiciones rigurosas al polinucleótido, su equivalente o su complemento;

(g) un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que reconoce o se une específicamente a uno cualquiera de (a) a (e), o un equivalente o fragmento de cada uno de los mismos;

(h) un polinucleótido aislado o recombinante que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de (g);

(i) y una célula presentadora de antígeno pulsada con uno cualquiera de (a) a (e); y

(j) y una célula presentadora de antígeno transfectada con uno o más polinucleótidos que codifican uno cualquiera de (a) a (e).

En un aspecto particular, el agente interferente es un polipéptido de factor de integración del hospedador (IHF) aislado o recombinante o un fragmento del mismo, un fragmento C-terminal de un polipéptido de IHF, o un equivalente de cada uno de los mismos. En otro aspecto particular, el agente interferente es un polipéptido de HU aislado o recombinante o un fragmento del mismo, un fragmento C-terminal de un polipéptido de HU, o un equivalente de cada uno de los mismos. Algunos ejemplos no limitantes de los mismos son un polipéptido de IHF o HU alfa o beta; un polipéptido de IHF; HU de *Moraxella catarrhalis*; HupA, HupB, himA, himD de *E. coli*; HU de *E. faecalis* (tal como V583), HMGB1 (grupo de caja 1 de alta movilidad, una proteína con unión a ADN y especificidades de sustrato de ADN similares pero no de la secuencia de aminoácidos primaria de la familia de proteínas DNABII; un ortólogo funcional) y las identificadas en la Tabla 8 o la Tabla 10.

En un aspecto adicional, los métodos comprenden además, o alternativamente consisten básicamente en, o aún más consistente en, administrar al sujeto una cantidad eficaz 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 vacuna tal como un antígeno de superficie, por ejemplo OMP P5, rsPilA, OMP 26, OMP P2, o proteína Pilina de Tipo IV (véanse, Jurcisek y Bakaletz (2007) J. of Bacteriology 189(10):3868-3875 y Murphy, TF, Bakaletz, LO y Smeesters, PR (2009) The Pediatric Infectious Disease Journal, 28:S121-S126).

Los agentes y las composiciones de la presente divulgación se pueden administrar de forma concurrente o secuencial con otros agentes antimicrobianos y/o antígenos de superficie. En un aspecto particular, la administración es por vía local al sitio de la infección mediante inyección directa o mediante inhalación, por ejemplo. Otros ejemplos no limitantes de administración incluyen mediante uno o más métodos que comprenden por vía transdérmica, uretral, sublingual, rectal, vaginal, ocular, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, mediante inhalación o por vía oral. Las infecciones y enfermedades microbianas que se pueden tratar mediante los usos médicos de la presente invención incluyen infección mediante los organismos identificados en el Experimento n.º 1 y la Tabla 8, por ejemplo *Streptococcus agalactiae*, *Neisseria meningitidis*, *Treponemes*, *denticola*, *pallidum*), *Burkholderia cepacia*), o *Burkholderia pseudomallei*. En un aspecto, la infección microbiana es una o más de *Haemophilus influenzae* (no tipificable), *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*. Estas infecciones microbianas pueden estar presentes en las vías aéreas superiores, medias e inferiores (otitis, sinusitis, bronquitis pero también exacerbaciones de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), tos crónica, complicaciones y/o causa primaria de fibrosis quística (CF) y neumonía adquirida en la comunidad (CAP). De ese modo, poniendo en práctica los usos médicos *in vivo* de la presente invención, también se pueden prevenir o tratar estas enfermedades y las complicaciones de estas infecciones.

Las infecciones también se podrían producir en la cavidad oral (caries, periodontitis) y estar causadas por *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* l. Las infecciones también podrían estar localizadas en la piel (abscesos, infecciones de estafilococos, impétigo, infección secundaria de quemaduras, enfermedad de Lyme) y estar causadas por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Borrelia burgdorferi*. También se pueden tratar infecciones del tracto urinario (UTI) y están causadas por lo general por *Escherichia coli*. Las infecciones del tracto gastrointestinal (GI) (diarrea, cólera, cálculos biliares, úlceras gástricas) están causadas por lo general por *Salmonella enterica serovar*, *Vibrio cholerae* y *Helicobacter pylori*. Las infecciones del tracto genital incluyen y están causadas por lo general por *Neisseria gonorrhoeae*. Las infecciones pueden ser de la vesícula biliar o de un dispositivo alojado causadas por *Enterococcus faecalis*. Las infecciones asociadas a dispositivos prostáticos implantados, tales como reemplazos de cadera o

rodilla artificial, o implantes dentales, dispositivos médicos tales como bombas, catéteres, endoprótesis vasculares, o sistemas de monitorización, por lo general causadas por una diversidad de bacterias, se pueden tratar mediante los usos médicos de la presente invención. Estos dispositivos se pueden revestir o conjugar con un agente que se describe en el presente documento. De ese modo, poniendo en práctica los usos médicos *in vivo* de la presente invención, también se pueden prevenir o tratar estas enfermedades y las complicaciones de estas infecciones.

Las infecciones causadas por *Streptococcus agalactiae* también se pueden tratar mediante los usos médicos de la presente invención y es la causa principal de septicemia bacteriana en recién nacidos. También se pueden tratar infecciones causadas por *Neisseria meningitidis* que pueden causar meningitis.

De ese modo, las rutas de administración aplicables a los usos médicos de la invención incluyen las rutas de administración intranasal, intramuscular, uretral, intratraqueal, subcutánea, intradérmica, aplicación tópica, intravenosa, rectal, nasal, oral, inhalación, y otras rutas enterales y parenterales. Las rutas de administración se pueden combinar, si se desea, o ajustar dependiendo del agente y/o del efecto deseado. Un agente activo se puede administrar en una dosis individual o en dosis múltiples. Las realizaciones de estos métodos y las rutas adecuadas para su suministro incluyen rutas sistémicas o localizadas. En general, las rutas de administración adecuadas para usos médicos de la invención incluyen, pero no se limitan a, inyección directa, y las rutas enteral, parenteral o por inhalación.

Las rutas parenterales de administración distintas de la administración por inhalación incluyen, pero no se limitan a, las rutas tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intraorbital, intracapsular, intraespinal, intraesternal, e intravenosa, es decir, cualquier ruta de administración distinta de a través del canal alimentario. La administración parenteral se puede llevar a cabo para efectuar el suministro sistémico o local del agente inhibidor. Cuando se desea suministro sistémico, por lo general la administración implica la administración invasiva o tópica o mucosa absorbida sistémicamente de preparaciones farmacéuticas.

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

Los métodos de administración de la sustancia activa a través de la piel o la mucosa incluyen, pero no se limitan a, aplicación tópica de una preparación farmacéutica adecuada, transmisión transcutánea, transmisión transdérmica, inyección y administración epidérmica. Para la transmisión transdérmica, son adecuados promotores de la absorción o métodos de iontoforesis. La transmisión iontoforética se puede conseguir usando "parches" disponibles en el mercado que suministran su producto de forma continua mediante pulsos eléctricos a través de piel sin romper durante periodos de varios días o más.

En diversas realizaciones de los usos médicos de la invención, el agente interferente se administrará por inhalación, inyección o por vía oral en una base diaria continua, al menos una vez al día (QD), y en diversas realizaciones dos veces al día (BID), tres veces al día (TID), o incluso cuatro veces al día. Por lo general, la dosis diaria terapéuticamente eficaz 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, en ocasiones, dependiendo del compuesto hasta tanto como aproximadamente 1 g a aproximadamente 2,5 g.

La dosificación se puede conseguir de acuerdo con los usos médicos 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.

La dosificación, toxicidad y eficacia terapéutica de las composiciones descritas en el presente documento se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (dosis letal para un 50 % de la población) y la DE50 (dosis terapéuticamente eficaz en un 50 % de la población). La proporción de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la proporción DL50/DE50. Las composiciones que exhiben índices terapéuticos altos son preferentes. Aunque se pueden usar compuestos que exhiban efectos secundarios tóxicos, se debería poner especial cuidado en el diseño de un sistema de suministro que fije como diana tales compuestos al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial en células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos está preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en los métodos, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis se puede formular en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en plasma en circulación que incluya la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición semimáxima de los síntomas) según se

determina en cultivo celular. Tal información se puede usar para determinar de forma más precisa dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

En algunas realizaciones, una cantidad eficaz de una composición suficiente para conseguir 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 forma 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 en forma de una dosis inicial, seguida por una o más dosis de "refuerzo". Las dosis de refuerzo se pueden proporcionar 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, una dosis de refuerzo se administra después de una evaluación de la respuesta del sujeto a las administraciones previas.

El experto en la materia entenderá que ciertos factores pueden influir en la dosificación y el tiempo requeridos para tratar de forma eficaz a un sujeto, que incluyen, pero no se limitan a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos previos, el estado general de salud y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones terapéuticas descritas en el presente documento puede incluir un tratamiento individual o una serie de tratamientos.

Polipéptidos

En el presente documento también se proporcionan agentes interferentes y composiciones para su uso en los métodos descritos en el presente documento, en los que el agente interferente es del grupo:

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

(b) una proteína de tipo histona aislada o recombinante de un 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 un polipéptido aislados o recombinantes identificados en la Tabla 8, la Tabla 9A, la Tabla 9B, la Tabla 10 o un péptido de unión a ADN identificado en la Figura 6, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(d) un polipéptido aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 1 a 35, 37 a 340, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos;

(e) un polipéptido C-terminal aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, 42 a 100, la Tabla 8 o los polipéptidos C-terminales identificados en la Tabla 10 o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos; o

(f) un polipéptido o un polinucleótido que compite con un factor de integración del hospedador en la unión a un ADN microbiano.

En un aspecto particular, el agente interferente es un polipéptido DNABII aislado recombinante o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos. Algunos ejemplos no limitantes de los mismos son un polipéptido de IHF o HU alfa o beta; un polipéptido de IHF α ; HU de *Moraxell acatarrhalis*; HupA, HupB, himA, himD de *E. coli*; HU de *E. faecalis* (tal como V583), HMGB1 y los identificados en la Tabla 8.

En otro aspecto, el agente interferente es un polipéptido aislado o recombinante que consiste básicamente en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NOS: 1 a 5 o 12 a 27, 30 a 35, 101-340 o un péptido de unión a ADN identificado en la Figura 6.

En otro aspecto, el polipéptido aislado o recombinante comprende, o alternativamente consiste básicamente en, o aún más consiste en la SEQ ID NO: 1 o 2, con la condición de que el polipéptido no sea ninguna de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100.

En otro aspecto, el polipéptido aislado o recombinante comprende, o alternativamente consiste básicamente en, o aún más consiste en la SEQ ID NO: 3, 4 o 5, con la condición de que el polipéptido no sea ninguna de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100.

En otro aspecto, el polipéptido aislado o recombinante comprende, o alternativamente consiste básicamente en, o aún más 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 sea ninguna de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100.

En otro aspecto, el polipéptido aislado o recombinante comprende, o alternativamente consiste básicamente en, o aún más 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 ninguna de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100.

En otro aspecto, el polipéptido aislado o recombinante comprende, o alternativamente consiste básicamente en, o aún más consiste en un polipéptido aislado o recombinante del grupo de:

un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 12 y 13;
 un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 14 y 15;
 un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 16 y 17;
 un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 18 y 19;
 un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 20 y 21;
 un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 23 y 24;
 un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 25 y 26;
 un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 30 y 31;
 un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 32 y 33;
 un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 34 y 35;
 un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 337 y 338; o
 un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 339 y 340;
 con la condición de que el polipéptido no sea ninguno de tipo natural de uno cualquiera de IHF alfa, IHF beta, o las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100.

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

un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 12 y 13;
 un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 14 y 15;
 un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 16 y 17;
 un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 18 y 19;
 un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 20 y 21;
 un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 23 y 24;
 un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 25 y 26;
 un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 30 y 31;
 un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 32 y 33;
 un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 34 y 35;
 un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 337 y 338; o
 un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 339 y 340;
 con la condición de que el polipéptido no sea ninguno de tipo natural de uno cualquiera de IHF alfa, IHF beta, o las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100.

Además, se proporcionan como agentes para su uso en los métodos de la presente divulgación fragmentos o un equivalente de los polipéptidos aislados 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 básicamente en, o aún más consiste en dos o más de los polipéptidos aislados o recombinantes descritos anteriormente.

Por ejemplo, el polipéptido aislado o recombinante comprende, o alternativamente consiste básicamente en, o aún más consiste en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 6, 12 a 27 o 30 a 33, o un fragmento o un polipéptido equivalente, cuyos ejemplos se identifican en la Tabla 8 o se muestran en la Tabla 9A, la Tabla 9B o la Tabla 10. En un aspecto, se excluyen los polipéptidos de tipo natural aislados, es decir, el polipéptido no es ninguna de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o una secuencia de tipo natural identificada en la Tabla 8 o mostrada en la Tabla 9A.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un polipéptido aislado o recombinante que consiste básicamente en una secuencia de aminoácidos del grupo de las SEQ ID NOS: 1 a 6, 12 a 27 o 30 a 35, 1 a 6 y 13 a 35, o un polipéptido que comprende, o que alternativamente consiste básicamente en, o aún más que consiste en, un aminoácido que corresponde a los fragmentos β -3 y/o α -3 de un IHF α o IHF β de *Haemophilus influenzae*, cuyos ejemplos no limitantes incluyen las SEQ ID NOS: 12 a 27, o un fragmento o equivalente del mismo de cada uno de los mismos. En otro aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende, o que alternativamente consiste básicamente en, o aún más que consiste en una secuencia de aminoácidos del grupo de las SEQ ID NOS: 1 a 4, o un fragmento o un equivalente de cada una de las mismas, o un polipéptido que comprende, o que alternativamente consiste básicamente en, o aún más que consiste en un aminoácido que corresponde a los fragmentos β -3 y/o α -3 de un IHF α o IHF β de *Haemophilus influenzae*, cuyos ejemplos no limitantes incluyen las SEQ ID NOS: 12 a 27, o un fragmento o equivalente biológico de los mismos 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 los extremos amino y/o carboxi terminales del polipéptido. En un aspecto, se excluyen polipéptidos de unión a ADN de tipo natural aislados, es decir, el polipéptido no es ninguna de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100 o una secuencia de polipéptidos de tipo natural aislada enumerada en la Tabla 8 o mostrada en la Tabla 9A.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un polipéptido aislado recombinante que comprende, o que alternativamente consiste básicamente en, o aún más que consiste en, las SEQ ID NOS: 1 o 2 solas o en combinación con un polipéptido que comprende, o que alternativamente consiste básicamente en, o aún más que consiste en un aminoácido que corresponde a los fragmentos β -3 y/o α -3 de un IHF α o IHF β de *Haemophilus influenzae*, cuyos ejemplos no limitantes incluyen las SEQ ID NOS: 12 a 27 o un fragmento o un equivalente

biológico de cada una de las mismas. En un aspecto, se excluyen polipéptidos de unión a ADN de tipo natural aislados, es decir, el polipéptido no es ninguna de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100 o una secuencia de polipéptidos de tipo natural aislada enumerada en la Tabla 8 o mostrada en la Tabla 9A.

5 En otro aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende o que alternativamente consiste básicamente en, o aún más que consiste en, las SEQ ID NOS: 3 o 4 o un fragmento o un equivalente de cada una de las mismas, solas o en combinación con un polipéptido que comprende, o que alternativamente consiste básicamente en, o aún más que consiste en un aminoácido que corresponde a los fragmentos β -3 y/o α -3 de un IHF α o IHF β de *Haemophilus influenzae*, cuyos ejemplos no limitantes incluyen las
10 SEQ ID NOS: 12 a 27, y 34-35 o un equivalente biológico de cada una de las mismas. En un aspecto, se excluyen polipéptidos de unión a ADN de tipo natural aislados, es decir, el polipéptido no es ninguna de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, o 42 a 100 o una secuencia de polipéptidos de tipo natural aislada enumerada en la Tabla 8 o mostrada en la Tabla 9A.

15 La presente divulgación también proporciona polipéptidos aislados o recombinantes que comprenden o que alternativamente consisten básicamente en, o aún más que 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 o los catorce polipéptidos aislados o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos. Algunos ejemplos de los mismos incluyen polipéptidos aislados o recombinantes que comprenden las SEQ ID NOS: 1 a 4, por ejemplo,
20 las SEQ ID NOS: 1 y 2, o alternativamente 1 y 3 o alternativamente 1 y 4, o alternativamente 2 y 3, o alternativamente las SEQ ID NOS: 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, las SEQ ID NOS: 1, 2, y 3 o las SEQ ID NOS: 3, 2 y 1 o alternativamente 2, 1 y 3, o alternativamente, 3, 1 y 2. Los equivalentes biológicos de estos polipéptidos se incluyen además en la presente divulgación con la condición de que las secuencias no incluyan secuencias de tipo natural
25 aisladas tales como las identificadas en las Tablas 8 y 9.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un polipéptido aislado o recombinante que comprende o que alternativamente consiste básicamente en, o aún más que consiste en, las SEQ ID NOS: 1 o 2 y 3 o 4, o un fragmento o un equivalente de cada una de las mismas, con la condición de que el polipéptido no sea ninguna de las
30 SEQ ID NOS: 5 a 10, y pueden comprender además una cualquiera o más de las SEQ ID NOS: 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 esta realización, la SEQ ID NO: 1 o 2 está situada corriente arriba o en el extremo amino terminal de la SEQ ID NO: 3 o 4, con la condición de que la secuencia de aminoácidos no sea un polipéptido de tipo natural aislado, por ejemplo ninguna de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28 y
35 29. En otro aspecto, el polipéptido aislado comprende la SEQ ID NO: 3 o 4 situada corriente arriba o en el extremo amino terminal de la SEQ ID NO: 1 o 2. Los fragmentos o equivalentes biológicos de estos polipéptidos están incluidos además en la presente divulgación con la condición de que la secuencia no incluya polipéptidos de tipo natural aislados.

40 En una realización, se excluye cualquier polipéptido o proteína que tenga identidad de secuencia con los polipéptidos de tipo natural o los desvelados en Pedulla *et al.* (1996) PNAS 93:15411-15416.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, se puede añadir un conector peptídico a los extremos N-terminal o C-terminal del polipéptido. Un "conector" o "conector peptídico" se refiere a una secuencia peptídica unida al extremo
45 N-terminal o al extremo C-terminal de una secuencia polipeptídica. En un aspecto, el conector tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de aminoácido de longitud o alternativamente de 2 a aproximadamente 10, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 restos de aminoácido de longitud. Un ejemplo de un conector 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:
50 40) y Ser-Leu-Lys-Leu (SEQ ID NO: 41).

Los polipéptidos aislados de la presente divulgación se pretende que incluyan polipéptidos y proteínas de origen natural y producidos de forma recombinante aislados de células hospedadoras procariotas y eucariotas, así como muteínas, análogos y fragmentos de los mismos, y los ejemplos de tales células se han descrito anteriormente. En
55 algunas realizaciones, el término también incluye anticuerpos y anticuerpos anti-idiotípicos como se describen en el presente documento. Tales polipéptidos se pueden aislar o producir usando los métodos conocidos en la técnica descritos en resumen en el presente documento.

Se entiende que los equivalentes o las variantes funcionales del polipéptido o la proteína de tipo natural también
60 están dentro del ámbito de la presente divulgación, por ejemplo, los que tienen sustituciones de aminoácidos conservativas de los aminoácidos; véase, por ejemplo, la Tabla 9. Otros análogos incluyen proteínas de fusión que comprenden una proteína o un polipéptido de la presente divulgación que puede incluir un polipéptido unido a una matriz presentadora de antígeno.

65 En un aspecto adicional, los polipéptidos están conjugados o unidos a un marcador detectable. Los marcadores adecuados se conocen en la técnica y se describen en el presente documento.

En otro aspecto adicional, los polipéptidos con o sin un marcador detectable pueden estar contenidos o pueden expresarse sobre la superficie de una célula hospedadora procariota o una célula hospedadora eucariota, tal como una célula dendrítica.

Las proteínas y los polipéptidos se pueden obtener mediante una diversidad de procesos conocidos por los expertos en la materia, que incluyen purificación, síntesis química y métodos recombinantes. Los polipéptidos se pueden aislar a partir de preparaciones tales como sistemas de célula hospedadora mediante métodos tales como inmunoprecipitación con anticuerpo, y técnicas convencionales tales como filtración en gel, intercambio iónico, fase inversa, 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, la presente divulgación también proporciona los procesos para obtener estos polipéptidos así como los productos obtenibles y obtenidos mediante estos procesos.

Los polipéptidos también se pueden obtener mediante síntesis química usando un sintetizador de péptidos automatizado disponible en el mercado tal como los fabricados por Perkin/ Elmer/Applied Biosystems, Inc., Modelo 430A o 431A, Foster City, CA, USA. El polipéptido sintetizado se puede precipitar y purificar adicionalmente, por ejemplo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Por consiguiente, la presente divulgación también proporciona un proceso para sintetizar químicamente las proteínas de la presente divulgación mediante la provisión de la secuencia de la proteína y reactivos, tales como aminoácidos y enzimas y la unión conjunta de los aminoácidos en la orientación y secuencia lineal apropiadas.

Alternativamente, las proteínas y los polipéptidos pueden obtener mediante métodos recombinantes bien conocidos como se describe, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989), citado anteriormente, usando una célula hospedadora y sistemas de vector descritos en el presente documento.

También se proporcionan mediante la presente solicitud los polipéptidos escritos en el presente documento conjugados con un agente detectable para su uso en los métodos de diagnóstico. Por ejemplo, los polipéptidos marcados de forma detectable se pueden unir a una columna y se pueden usar para la detección y purificación de anticuerpos. También son útiles como inmunógenos para la producción de anticuerpos como se describe posteriormente. Los polipéptidos de la presente divulgación son útiles en un sistema de ensayo *in vitro* para analizar sistemáticamente agentes o fármacos, que modulan procesos celulares.

Los expertos en la materia conocen bien que se pueden realizar modificaciones en los péptidos de la divulgación para proporcionarlos con propiedades alteradas. Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo glicina y los isómeros ópticos tanto D como L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina habitualmente oligopéptido si la cadena del péptido es corta. Si la cadena del péptido es larga, el péptido se denomina habitualmente polipéptido o proteína.

Los péptidos de la divulgación se pueden modificar para incluir aminoácidos naturales. De ese modo, los péptidos pueden comprender D-aminoácidos, una combinación de D y L-aminoácidos, y diversos aminoácidos de "diseñador" (por ejemplo, beta-metil aminoácidos, C-alfa-metil aminoácidos, y N-alfa-metil aminoácidos, etc.) para conferir propiedades especiales a los péptidos. Además, mediante la asignación de aminoácidos específicos en etapas de acoplamiento específicos, se pueden generar péptidos con alfa-hélices, giros beta, láminas beta, giros gamma, y péptidos cíclicos. Por lo general, se cree que es preferente una estructura secundaria alfa-helicoidal o una estructura secundaria aleatoria.

Los polipéptidos de la presente divulgación también se pueden combinar con diversos vehículos de fase sólida, tales como un implante, una endoprótesis vascular, una pasta, un gel, un implante dental, o un implante médico o vehículos de fase líquida, tales como perlas, soluciones estériles o acuosas, vehículos farmacéuticamente aceptables, polímeros farmacéuticamente aceptables, liposomas, micelas, suspensiones y emulsiones. Algunos ejemplos de disolventes no acuosos incluyen propil etilenglicol, polietilenglicol y aceites vegetales. Cuando se usan para preparar anticuerpos o inducir una respuesta inmune *in vivo*, los vehículos también pueden incluir un adyuvante que sea útil para aumentar no específicamente una respuesta inmune específica. El experto en la materia puede determinar con facilidad si se requiere un adyuvante y seleccionarlo. Sin embargo, únicamente con fines de ilustración, los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, medio completo e incompleto de Freund, sales minerales y polinucleótidos. Otros adyuvantes adecuados incluyen monofosforil lípido A (MPL), derivados mutantes de la endotoxina térmicamente lábil de *E. coli*, derivados mutantes de la toxina del cólera, oligonucleótidos de CPG, y adyuvantes obtenidos a partir de escualeno.

La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende o que alternativamente consiste básicamente en, o aún más que consiste en, cualquiera de un polipéptido, análogo, muteína, o fragmento de la presente divulgación, solos o en combinación entre sí o con otros agentes, tales como un antibiótico y un vehículo aceptable o soporte sólido. Estas composiciones son útiles para diversos métodos diagnósticos y terapéuticos, como se describe en el presente documento.

Polinucleótidos

La presente divulgación también proporciona polinucleótidos aislados recombinantes que codifican uno o más de los polipéptidos aislados o recombinantes identificados anteriormente y sus respectivas cadenas complementarias. Además se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos aislados o recombinantes cuyos ejemplos se conocen en la técnica y se describen en resumen en el presente documento. En un aspecto en el que se va a expresar más de un polinucleótido aislado o recombinante como unidad individual, los polinucleótidos aislados recombinantes pueden estar contenidos en un vector policistrónico. Los polinucleótidos pueden ser ADN, ARN, ARNm o ARN interferente, tal como siARN, miARN o dsARN.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un agente interferente que es un polinucleótido que interfiere con la unión del ADN a un polipéptido o proteína en una biopelícula microbiana, o un polinucleótido de cruce de cuatro vías que recuerda una unión de Holliday, un polinucleótido de cruce de 3 vías que recuerda una horquilla de replicación, un polinucleótido que tiene flexibilidad inherente o un polinucleótido doblado que pueden tratar o inhibir un polinucleótido DNABII de la unión a ADN microbiano así como tratar, prevenir o inhibir la formación de una biopelícula y las infecciones y trastornos asociados. El experto en la materia puede preparar tales polinucleótidos usando la información que se proporciona en el presente documento y el conocimiento de los expertos en la materia. Véanse Goodman y Kay (1999) J. Biological Chem. 274(52):37004-37011 y Kamashev y Rouviere-Yaniv (2000) EMBO J. 19(23):6527-6535.

La divulgación proporciona además el polinucleótido aislado o recombinante unido operativamente a un promotor de transcripción de ARN, así como otras secuencias reguladoras para la replicación y/o la expresión transitoria o estable del ADN o ARN. Como se usa en el presente documento, la expresión "unido operativamente" significa situado de un modo tal que el promotor dirigirá la transcripción de ARN fuera de la molécula de ADN. Algunos ejemplos de tales promotores son SP6, T4 y T7. En ciertas realizaciones, se usan promotores específicos de células 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 de marcador seleccionables, así como un sitio de clonación en el que una pieza insertada de ADN se puede unir operativamente a ese promotor, se conocen en la técnica y están disponibles en el mercado. Para metodología general y estrategias de clonación, véanse Gene Expression Technology (Goeddel ed., Academic Press, Inc. (1991)) y las referencias citadas en el mismo y Vectors: Essential Data Series (Gacsa y Ramji, eds., John Wiley & Sons, N.Y. (1994)) que contiene mapas, propiedades funcionales, suministradores comerciales y una referencia a los números de acceso de GenEMBL para diversos vectores adecuados.

En una realización, los polinucleótidos obtenidos a partir de los polinucleótidos de la divulgación codifican polipéptidos o proteínas que tienen utilidades diagnósticas y terapéuticas como se describen en el presente documento así como sondas para identificar transcritos de la proteína que pueden estar o no estar presentes. Estos fragmentos de ácidos nucleicos se pueden preparar, por ejemplo, mediante digestión con enzimas de restricción de polinucleótidos más grandes y a continuación marcaje con un marcador detectable. Alternativamente, se pueden generar fragmentos aleatorios usando traducción de Nick de la molécula. Para metodología para la preparación y marcaje de tales fragmentos, véase Sambrook, *et al.* (1989), citado anteriormente.

Los vectores de expresión que contienen estos ácidos nucleicos son útiles para obtener sistemas de vector de hospedador para producir proteínas y polipéptidos. Se supone que estos vectores de expresión deben ser replicables en los organismos hospedadores como episomas o como parte integral del ADN cromosómico. Algunos ejemplos no limitantes de vectores de expresión adecuados incluyen plásmidos, vectores de levadura, vectores virales y liposomas. Los vectores adenovirales son particularmente útiles para la introducción de genes en tejidos *in vivo* debido a sus altos niveles de expresión y la transformación eficaz de células tanto *in vitro* como *in vivo*. Cuando se inserta un ácido nucleico en una célula hospedadora adecuada, por ejemplo, una célula procariota o eucariota y la célula hospedadora se replica, la proteína se puede producir de forma recombinante. Las células hospedadoras adecuadas dependerán del vector y pueden incluir células de mamífero, células de animales, células humanas, células de simio, células de insecto, células de levadura, y células bacterianas construidas usando métodos conocidos. Véase Sambrook, *et al.* (1989), citado anteriormente. Además del uso de un vector viral para la inserción de ácido nucleico exógeno en las células, el ácido nucleico se puede insertar en la célula hospedadora mediante métodos conocidos en la técnica tales como transformación para células bacterianas; transfección usando precipitación con fosfato de calcio para células de mamífero; o DEAE-dextrano; electroporación; o microinyección. Véase Sambrook, *et al.* (1989), citado anteriormente, para la metodología. De ese modo, la presente divulgación también proporciona una célula hospedadora, por ejemplo una célula de mamífero, una célula de 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.

Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si estuvieran presentes, se pueden impartir modificaciones a la estructura del nucleótido antes o después del montaje del polinucleótido. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida con componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido también se puede modificar después de la polimerización, tal como mediante

conjugación con un componente de marcaje. El término también se refiere a moléculas tanto bicatenarias como monocatenarias. A menos que se especifique o requiera de otro modo, cualquier realización de la presente divulgación que sea un polinucleótido incluye tanto la forma bicatenaria como cada una de las dos formas monocatenarias complementarias o que se predice que componen la forma bicatenaria.

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

La presente divulgación también proporciona células modificadas genéticamente que contienen y/o expresan los polinucleótidos de la presente divulgación. Las células modificadas genéticamente se pueden producir mediante inserción de secuencias reguladoras corriente arriba tales como promotores o activadores génicos (véase el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.733.761).

Los polinucleótidos se pueden conjugar a un marcador detectable, por ejemplo, un marcador enzimático o un radioisótopo para la detección del ácido nucleico y/o la expresión del gen en una célula. Se conoce una amplia diversidad de marcadores detectables apropiados en la técnica, incluyendo ligandos fluorescentes, radioactivos, enzimáticos u otros ligandos, tales como avidina/biotina, que son capaces de dar una señal detectable. En un aspecto, probablemente se deseará emplear un marcador fluorescente o una etiqueta enzimática, tal como ureasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa, el lugar de reactivos radioactivos u otros reactivos medioambientalmente indeseables. En el caso de etiquetas enzimáticas, se pueden emplear sustratos indicadores colorimétricos para proporcionar un medio visible al ojo humano o espectrofotométricamente, para identificar la hibridación específica con muestras que contienen ácidos nucleicos complementarios. De ese modo, la presente divulgación proporciona además un método para detectar un polinucleótido monocatenario o su complemento, poniendo en contacto el polinucleótido monocatenario diana con un polinucleótido monocatenario marcado (una sonda) que es una parte del polinucleótido de la presente divulgación en condiciones que permiten hibridación (preferentemente condiciones de hibridación moderadamente rigurosas) de polinucleótidos monocatenarios complementarios o, más preferentemente, en condiciones de hibridación altamente rigurosas. Los pares de polinucleótidos hibridados se separan de los polinucleótidos monocatenarios sin hibridar. Los pares de polinucleótidos hibridados se detectan usando métodos conocidos por los expertos en la materia y que se exponen, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989), citado anteriormente.

El polinucleótido realizado en la presente divulgación se puede obtener usando síntesis química, métodos de clonación recombinantes, PCR, o cualquier combinación de los mismos. Los métodos de síntesis química de polinucleótidos se conocen en la técnica y no necesitan describirse con detalle en el presente documento. El experto en la materia puede usar los datos de secuencia provistos en el presente documento para obtener un polinucleótido deseado empleando un sintetizador de ADN o realizando un pedido a un servicio comercial.

Los polinucleótidos de la presente divulgación se pueden aislar o replicar usando PCR. La tecnología de PCR es la materia objeto de los documentos de Patente de Estados Unidos con números 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) citado anteriormente, y las referencias citadas en los mismos. Alternativamente, el experto en la materia puede usar las secuencias provistas en el presente documento y un sintetizador de ADN comercial para replicar el ADN. Por consiguiente, la presente divulgación también proporciona un proceso para obtener los polinucleótidos de la presente divulgación mediante la provisión de la secuencia lineal del polinucleótido, nucleótidos, moléculas de cebador apropiadas, compuestos químicos tales como enzimas e instrucciones para su replicación y la replicación o unión química de los nucleótidos en la orientación apropiada para obtener los polinucleótidos. En una realización separada, estos polinucleótidos además se aíslan. Además, el experto en la materia puede insertar el polinucleótido en un vector de replicación adecuado e insertar el vector en una célula hospedadora adecuada (procariota o eucariota) para replicación y amplificación. El ADN amplificado de ese modo se puede aislar de la célula mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Además, en el presente documento se proporciona un proceso para obtener polinucleótidos mediante este método así como los polinucleótidos obtenidos de ese modo.

El ARN se puede obtener insertando en primer lugar un polinucleótido de ADN en una célula hospedadora adecuada. El ADN se puede suministrar mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, mediante el uso de un vehículo de suministro génico apropiado (por ejemplo, liposoma, plásmido o vector) o mediante electroporación.

Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe a ARN, el ARN se puede aislar a continuación usando métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, como se expone en Sambrook *et al.* (1989), citado anteriormente. Por ejemplo, el ARNm se puede aislar usando diversas enzimas líticas o soluciones químicas de acuerdo con los procedimientos que se exponen en Sambrook *et al.* (1989), citado anteriormente, o extraído mediante resinas de unión a ácidos nucleicos siguiendo las instrucciones acompañantes provistas por los fabricantes.

Los polinucleótidos que exhiben complementariedad u homología de secuencia con respecto a un polinucleótido de la presente divulgación son útiles como sondas de hibridación o como un equivalente de los polinucleótidos específicos identificados en el presente documento. Dado que se conoce la secuencia de codificación completa del transcrito, cualquier parte de esta secuencia o las secuencias homólogas se pueden usar en los métodos de la presente divulgación.

Se conoce en la técnica que no es necesaria una sonda "perfectamente emparejada" para una hibridación específica. Los cambios minoritarios en la secuencia de la sonda conseguidos mediante sustitución, delección o inserción de un pequeño número de bases no afecta a la especificidad de la hibridación. En general, como mucho se puede tolerar un desemparejamiento de bases de un 20 % (cuando están óptimamente alineadas). Preferentemente, una sonda útil para detectar el ARNm mencionado anteriormente es al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la región homóloga. Más preferentemente, la sonda es un 85 % idéntica a la correspondiente secuencia génica después de alineación de la región homóloga; incluso más preferentemente, exhibe un 90 % de identidad.

Estas sondas se pueden usar en radioensayos (por ejemplo, análisis de transferencia de 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 su uso en ensayos de análisis sistemático de alto rendimiento para la detección de expresión del gen que corresponde a un polinucleótido de la presente divulgación. Por consiguiente, la presente divulgación también proporciona una sonda que comprende o que corresponde con un polinucleótido de la presente divulgación, o su equivalente, o su complemento, o un fragmento del mismo, unido a un soporte sólido para su uso en análisis sistemático de alto rendimiento.

El tamaño total de fragmento, así como el tamaño de los tramos complementarios, dependerá del uso pretendido o la aplicación del segmento de ácido nucleico particular. Los fragmentos más pequeños encontrarán uso por lo general en realizaciones de hibridación, en las que la longitud de la región complementaria se 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 se deseen detectar.

Las sondas de nucleótidos que tienen secuencias complementarias en tramos mayores de 5 a 10 nucleótidos de longitud son generalmente preferentes, para aumentar la estabilidad y la selectividad del híbrido, y para mejorar de ese modo la especificidad de las moléculas híbridas particulares obtenidas. Más preferentemente, se pueden diseñar polinucleótidos que tienen tramos de complementariedad génica de 10 o más o más de 50 nucleótidos de longitud, o incluso una longitud mayor cuando se desee. Tales fragmentos se pueden preparar con facilidad, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento por medios químicos, por aplicación de tecnología de reproducción de ácidos nucleicos, tal como la tecnología de PCR con dos oligonucleótidos de cebado como se describe en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.603.102 o introduciendo 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 divulgación pueden servir como cebadores para la detección de genes o transcritos génicos que se expresan en las células descritas en el presente documento. En este contexto, amplificación significa cualquier método que emplea una polimerasa dependiente de cebador capaz de replicación de una secuencia diana con una fidelidad razonable. La amplificación se puede llevar a cabo mediante ADN polimerasas naturales o recombinantes tales como ADN polimerasa de T7, fragmento Klenow de ADN polimerasa de *E. coli*, y transcriptasa inversa. Únicamente con fines de ilustración, un cebador tiene la misma longitud que la identificada para las sondas.

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

Se han desarrollado métodos para administrar una cantidad eficaz de un vector o vehículo de suministro génico a una célula y se conocen por los expertos en la materia y se describen en el presente documento. Los métodos para detectar la expresión génica en una célula se conocen en la técnica e incluyen técnicas tales como hibridación en micromatrices de ADN, hibridación *in situ*, PCR, ensayos de protección de ARNasa y análisis de transferencia de Northern. Tales métodos son útiles para detectar y cuantificar la expresión del gen en una célula. Alternativamente, la expresión del polipéptido codificado se puede detectar mediante diversos métodos. 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 de Western. Estas técnicas se pueden usar para determinar el nivel de expresión del polinucleótido expresado.

5 Anticuerpos y derivados de los mismos

La presente divulgación también proporciona un anticuerpo que se une y/o reconoce específicamente y se une a un polipéptido aislado para su uso en los métodos de la divulgación. El anticuerpo puede ser cualquiera de los diversos anticuerpos descritos en el presente documento, cuyos ejemplos no limitantes incluyen un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo con remodelación superficial, un dianticuerpo, un anticuerpo humanizado, un derivado de anticuerpo, un anticuerpo humanizado recombinante, o un derivado o fragmento de cada uno de los mismos. En un aspecto, el fragmento comprende, o alternativamente consiste básicamente en, o aún más consiste en la CDR del anticuerpo. En un aspecto, el anticuerpo se marca de forma detectable o comprende además un marcador detectable conjugado al mismo. También se proporciona una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de la presente divulgación. Además, en el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden o que alternativamente consisten básicamente en o aún más, que consisten en una o más de las realizaciones anteriores. Además, se proporcionan polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos y los fragmentos así como métodos para producir de forma recombinante o sintetizar químicamente los polipéptidos de anticuerpo y los fragmentos de los mismos. Los polipéptidos de anticuerpo se pueden producir en una célula eucariota o procariota, o mediante otros métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento.

Se pueden generar anticuerpos usando técnicas convencionales conocidas en la técnica y que están bien descritas en la bibliografía. Existen varias metodologías para la producción de anticuerpos policlonales. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales se producen por lo general por inmunización de un mamífero adecuado tal como, pero no limitado a, gallinas, cabras, cobayas, hámsteres, caballos, ratones, ratas, y conejos. Se inyecta un antígeno en el mamífero, que induce a los linfocitos B a producir inmunoglobulinas específicas para el antígeno. Las inmunoglobulinas se pueden purificar del suero de un mamífero. Los anticuerpos específicos frente a IHF α e IHF β se pueden generar por inyección de los polipéptidos correspondientes a diferentes epítopos de IHF α e IHF β . Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos usando los 20 aminoácidos de cada subunidad tales como TFRPGQKLKSRVENASPKDE (SEQ ID NO: 34) para IHF α y KYVPHFKPGKELDRANIYG (SEQ ID NO: 35) para IHF β . Las variaciones de esta metodología incluyen modificación de adyuvantes, rutas y sitio de administración, volúmenes de inyección por sitio y el número de sitios por animal para producción óptima y tratamiento humano del animal. Por ejemplo, los adyuvantes se usan por lo general para mejorar o potenciar una respuesta inmune a antígenos. La mayoría de los adyuvantes proporcionan un depósito de antígeno del sitio de inyección, que permite una liberación lenta del antígeno en los ganglios linfáticos de drenaje. Otros adyuvantes incluyen tensioactivos que estimulan la concentración de moléculas de antígeno proteico en una gran área superficial y moléculas inmunoestimuladoras. Algunos ejemplos no limitantes de adyuvantes para generación de anticuerpos policlonales incluyen adyuvantes de Freund, sistema de adyuvantes de Ribí y Titermax. Los anticuerpos policlonales se pueden generar usando métodos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 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.

Se pueden generar anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma convencionales conocidas en la técnica y que están bien descritas en la bibliografía. Por ejemplo, un hibridoma se produce por fusión de una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como, pero no limitada a, 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, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIIWA, NEURO 2A, CHO, PerC.6, YB2/0) o similar, o heteromielomas, productos de fusión de los mismos, o cualquier célula o célula de fusión obtenida a partir de los mismos, o cualquier otra línea celular adecuada que se conozca en la técnica (véanse las que aparecen en las siguientes direcciones web, por ejemplo atcc.org, lifetech.com., con último acceso el 26 de noviembre de 2007), con células productoras de anticuerpos tales como, pero no limitadas a, células de bazo aisladas o clonadas, sangre periférica, linfa, amígdala, u otras células inmunes o que contienen linfocitos B, o cualquier otra célula que expresa secuencias constantes o variables de cadena ligera o pesada o de marco o de CDR, ya sea en forma de ácido nucleico endógeno o heterólogo, en forma de ADN recombinante o endógeno, viral, bacteriano, de alga, procariota, de anfibio, de insecto, de reptil, de pez, de mamífero, de roedor, equino, ovino, de cabra, de oveja, de primate, eucariota, genómico, ADNc, ADNr, ADN o ARN mitocondrial, ADN o ARN de cloroplasto, hnARN, ARNm, ARNt, de cadena individual, doble o triple, hibridado, y similar o cualquier combinación de los mismos. Las células productoras de anticuerpos también se pueden obtener de la sangre periférica o, preferentemente, del bazo o los ganglios linfáticos, de seres humanos u otros animales adecuados que se han inmunizado con el antígeno de interés. También se puede usar cualquier otra célula hospedadora adecuada para la expresión de ácidos nucleicos heterólogos o endógenos que codifican un anticuerpo, un fragmento específico o una variante del mismo, de la presente divulgación. Las células fusionadas (hibridomas) o las células recombinantes se pueden aislar usando condiciones de cultivo selectivas u otros métodos conocidos adecuados, y se pueden clonar mediante dilución limitante o clasificación celular, u otros métodos conocidos.

Se pueden usar otros métodos adecuados de producción o aislamiento de anticuerpos de la especificidad requerida que incluyen, pero no se limitan a, métodos que seleccionan un anticuerpo recombinante de una biblioteca de péptidos o proteínas (por ejemplo, pero no limitado a, una biblioteca de presentación de bacteriófagos, ribosomas, oligonucleótidos, ARN, ADNc, o similar; por ejemplo, como se encuentra disponible en diversos vendedores comerciales tales como MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.), BiolInvent (Lund, Suecia), Affitech (Oslo, Noruega) usando métodos conocidos en la técnica. Los métodos conocidos en la técnica se describen en la bibliografía de patente, algunos de los cuales incluyen los documentos de Patente de Estados Unidos con números 4.704.692; 5.723.323; 5.763.192; 5.814.476; 5.817.483; 5.824.514; 5.976.862. Los métodos alternativos se basan en 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 el presente documento. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, presentación 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 célula individual (por ejemplo, método de anticuerpos de linfocitos seleccionados ("SLAM") (documento de Patente de Estados Unidos n.º 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 linfocitos B (Steenbakkers *et al.* (1994) Molec. Biol. Reports 19:125-134).

Los derivados de anticuerpo de la presente divulgación también se pueden preparar por suministro de un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente divulgación a un hospedador 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 métodos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.827.690; 5.849.992; 4.873.316; 5.849.992; 5.994.616; 5.565.362; y 5.304.489.

La expresión "derivado de anticuerpo" incluye modificaciones postraduccionales en la secuencia de polipéptido lineal del anticuerpo o fragmento. Por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.602.684 B1 describe un método para la generación de formas modificadas con glicol de anticuerpos, incluyendo moléculas de anticuerpo completas, fragmentos de anticuerpo, o proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, que tiene una toxicidad celular mediada por Fc mejorada, y las glicoproteínas generadas de ese modo.

Los anticuerpos de la divulgación también incluyen derivados que se modifican mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de un modo tal que la unión covalente no evite que el anticuerpo genere una respuesta anti-idiotípica. Los derivados de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que se han modificado mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Además, los derivados pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los derivados de anticuerpo también se pueden preparar por suministro de un polinucleótido de la presente divulgación para proporcionar plantas transgénicas y células de plantas cultivadas (por ejemplo, pero no limitadas a, tabaco, maíz, y lenteja de agua) que producen tales anticuerpos, partes específicas o variantes en las partes de plantas o en las células cultivadas a partir de las mismas. Por ejemplo, Cramer *et al.* (1999) Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118 y las referencias citadas en el mismo, describen la producción de hojas de tabaco transgénico que expresan grandes cantidades de proteínas recombinantes, por ejemplo, usando un promotor inducible. Se ha usado maíz transgénico para expresar proteínas de mamífero 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 las referencias citadas en el mismo. También se han producido derivados de anticuerpo en grandes cantidades a partir de semillas de plantas transgénicas que incluyen fragmentos de anticuerpo, tales como anticuerpos de cadena individual (scFv's), incluyendo semillas de tabaco y tubérculos de patata. Véase, por ejemplo, Conrad *et al.* (1998) Plant Mol. Biol. 38:101-109 y las referencias citadas en el mismo. De ese modo, también se pueden producir anticuerpos usando plantas transgénicas, de acuerdo con métodos conocidos.

También se pueden producir derivados de anticuerpo, por ejemplo, por adición de secuencias exógenas para modificar la inmunogenicidad o para reducir, potenciar o modificar la unión, afinidad, tasa de unión, tasa de escisión, avidez, especificidad, semivida, o cualquier otra característica adecuada. Por lo general, se mantiene una parte o la totalidad de las secuencias de CDR no humanas o humanas mientras que las secuencias no humanas de las regiones variables y constantes se reemplazan con humanas u otros aminoácidos.

En general, los restos de la CDR están directamente y lo más sustancialmente implicados en influir la unión a antígeno. La humanización o ingeniería de anticuerpos se puede llevar a cabo usando cualquier método conocido tal como, pero no limitado a, los que se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 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 divulgación se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal de referencia preparado usando técnicas de biología molecular convencionales. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera se puede obtener del hibridoma de interés y se puede someter a ingeniería para que contenga secuencias de inmunoglobulina que no son de referencia (por ejemplo, humanas) usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas se pueden unir a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones de la CDR murina se pueden insertar en un marco humano usando métodos conocidos en la técnica (documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.225.539 y documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370). Del mismo modo, para crear un anticuerpo primatizado, las regiones de la CDR murina se pueden insertar en un marco de primate usando métodos conocidos en la técnica (documentos de Patente WO 93/02108 y WO 99/55369).

Las técnicas para preparar anticuerpos parcial o completamente humanos se conocen en la técnica y se puede usar cualquiera de tales técnicas. De acuerdo con una realización, las secuencias de anticuerpos completamente humanos se preparan en un ratón transgénico que se ha sometido a ingeniería para expresar genes de anticuerpos de cadena pesada y ligera humanos. Se han preparado múltiples cepas de tales ratones transgénicos que pueden producir diferentes clases de anticuerpos. Los linfocitos B de los ratones transgénicos que se producen se pueden fusionar a un anticuerpo deseado para preparar líneas celulares de hibridoma para la producción continua del anticuerpo deseado (véanse, por ejemplo, Russel *et al.* (2000) *Infection and Immunity*, abril de 2000:1820-1826; Gallo *et al.* (2000) *European J. of Immun.* 30:534-540; Green (1999) *J. of Immun. Methods* 231:11-23; Yang *et al.* (1999A) *J. of Leukocyte Biology* 66:401-410; Yang (1999B) *Cancer Research* 59(6): 1236-1243; Jakobovits (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 31:33-42; Green y Jakobovits (1998) *J. Exp. Med.* 188(3):483-495; Jakobovits (1998) *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7(4):607-614; Tsuda *et al.* (1997) *Genomics* 42:413-421; Sherman-Gold (1997) *Genetic Engineering News* 17(14); Mendez *et al.* (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Jakobovits (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology, The Integrated Immune System Vol. IV*, 194.1-194.7; Jakobovits (1995) *Current Opinion in Biotechnology* 6:561-566; Mendez *et al.* (1995) *Genomics* 26:294-307; Jakobovits (1994) *Current Biology* 4(8):761-763; Arbones *et al.* (1994) *Immunity* 1(4):247-260; Jakobovits (1993) *Nature* 362(6417):255-258; Jakobovits *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(6):2551-2555; y documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.075.181).

Los anticuerpos de la presente divulgación también se pueden modificar para crear anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos quiméricos son aquellos en los que los diversos dominios de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos están codificados por ADN de más de una especie. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567.

Alternativamente, los anticuerpos de la presente divulgación también se pueden modificar para crear anticuerpos remodelados superficialmente. Los anticuerpos remodelados superficialmente son aquellos en los que los restos de aminoácido exteriores del anticuerpo de una especie se reemplazan juiciosamente o se "remodelan superficialmente" con los de una segunda especie de un modo tal que los anticuerpos de la primera especie no sean inmunogénicos para la segunda especie mediante lo cual se reduce la inmunogenicidad del anticuerpo. Dado que la antigenicidad de la proteína depende principalmente de la naturaleza de su superficie, la inmunogenicidad de un anticuerpo se podría reducir mediante el reemplazo de los restos expuestos que difieren de los encontrados habitualmente en otros anticuerpos de especie de mamífero. Este reemplazo juicioso de los restos exteriores tendría poco o ningún efecto en los dominios interiores, o en los contactos entre dominios. De ese modo, las propiedades de unión a ligando no se deberían ver afectadas como consecuencia de alteraciones que se limitan a los restos del marco de la región variable. Este proceso se denomina "remodelado superficial" dado que solo la superficie exterior o la piel del anticuerpo se altera, quedando sin alterar los restos de soporte restantes.

El procedimiento para el "remodelado superficial" hace uso de los datos de secuencia disponibles para dominios variables de anticuerpo humano compilados por Kabat *et al.* (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4ª ed., Bethesda, Md., National Institutes of Health, y otras bases de datos accesibles de los Estados Unidos de América y extranjeras (tanto de ácidos nucleicos como de proteínas). Algunos ejemplos no limitantes de los métodos usados para generar anticuerpos modificados superficialmente incluyen el documento de Patente EP 519596; el documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.797.492; y los descritos en Padlan *et al.* (1991) *Mol. Immunol.* 28(4-5):489-498.

La expresión "derivado de anticuerpo" también incluye "dianticuerpos" que 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 polipéptido (véanse, por ejemplo, los documentos de Patente EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448). Mediante el uso de un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno (véase también el documento de Patente de Estados Unidos n.º

6.632.926 de Chen *et al.* que desvela variantes de anticuerpo que tienen uno o más aminoácidos insertados en una región hipervariable del anticuerpo precursor y una afinidad de unión por un antígeno diana que es al menos aproximadamente dos veces más fuerte que la afinidad de unión del anticuerpo precursor para el antígeno).

La expresión "derivado de anticuerpo" incluye además moléculas de anticuerpo sometidas a ingeniería, fragmentos y dominios individuales tales como scFv, dAb, nanocuerpos, minicuerpos, unicuerpos, cuerpos de afinidad (Holliger & Hudson (2005) *Nature Biotech* 23(9): 1126-36; Documento de Publicación de Patente de Estados Unidos US 2006/0211088; documento de Publicación PCT W02007/059782; documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.831.012).

La expresión "derivado de anticuerpo" incluye además "anticuerpos lineales". El procedimiento para preparar 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-VH-C_H1) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser inespecíficos o monoespecíficos.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden recuperar y purificar de cultivos celulares recombinantes mediante métodos conocidos que incluyen, pero no se limitan a, purificación de proteína A, precipitación en sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxipatita y cromatografía de lectina. También se puede usar cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") para la purificación.

Los anticuerpos de la presente divulgación incluyen productos purificados de forma natural, productos de procedimientos sintéticos químicos, y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un hospedador eucariota que incluye, por ejemplo, células de levadura, planta superior, insecto y mamífero o, alternativamente, de un hospedador procariota como se ha descrito anteriormente. Se describen una diversidad de sistemas de producción anticuerpos en Birch & Radner (2006) *Adv. Drug Delivery Rev.* 58: 671-685.

Si un anticuerpo que se somete a ensayo se une a una proteína o polipéptido, entonces el anticuerpo que se somete a ensayo y los anticuerpos provistos por la presente divulgación son equivalentes. También es posible determinar sin experimentación indebida, si un anticuerpo tiene la misma especificidad que el anticuerpo de la presente divulgación determinando si el anticuerpo que se somete a ensayo evita que un anticuerpo de la presente divulgación se una a una proteína o polipéptido con el que el anticuerpo es normalmente reactivo. Si el anticuerpo que se somete a ensayo compite con el anticuerpo de la divulgación como se muestra mediante la disminución en la unión por parte del anticuerpo monoclonal de la presente divulgación, entonces es probable que los dos anticuerpos se unan al mismo epítipo o a un epítipo estrechamente relacionado. Alternativamente, se puede incubar previamente el anticuerpo de la presente divulgación con una proteína con la que es normalmente reactivo, y determinar si el anticuerpo que se somete a ensayo se inhibe en su capacidad de unión al antígeno. Si el anticuerpo que se somete a ensayo se inhibe entonces, con toda probabilidad, tiene la misma especificidad, o una especificidad estrechamente relacionada, por el epítipo que el anticuerpo de la presente divulgación.

El término "anticuerpo" también se pretende que incluya anticuerpos de todos los isotipos y subclases de inmunoglobulina. Los isotipos particulares de un anticuerpo monoclonal se pueden preparar directamente por selección de una fusión inicial, o se pueden preparar de forma secundaria, a partir de un hibridoma precursor que segrega un anticuerpo monoclonal de diferente isotipo mediante el uso de técnica de selección Sib para aislar las variantes de intercambio 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. Methods* 74:307.

El aislamiento de otros anticuerpos monoclonales con la especificidad de los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento también se puede conseguir por parte del experto habitual en la materia mediante la producción de anticuerpos anti-idiotípicos. Herlyn *et al.* (1986) *Science* 232:100. Un anticuerpo anti-idiotípico es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos presentes en el anticuerpo monoclonal de interés.

En algunos aspectos de la presente divulgación, será útil marcar de forma detectable o terapéuticamente el anticuerpo. Los marcadores adecuados se han descrito anteriormente. Los métodos para conjugar anticuerpos a estos agentes se conocen en la técnica. Únicamente con fines de ilustración, los anticuerpos se pueden marcar con un resto detectable tal como un átomo radiactivo, un cromóforo, un fluoróforo, o similar. Tales anticuerpos marcados se pueden usar para técnicas diagnósticas, ya sea *in vivo*, o en una muestra de ensayo aislada.

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 a continuación por medio de una segunda reacción. Por ejemplo, es común usar haptenos tales como biotina, que reacciona con avidina, o dinitrofenol, piridoxal, y fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos anti-haptenos específicos. Véase Harlow y Lane (1988), citado anteriormente.

La región variable de los anticuerpos de la presente divulgación se puede modificar por mutación de restos de

aminoácido en las regiones CDR 1, CDR 2 y/o CDR 3 de VH y/o VL para mejorar una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo. Las mutaciones se pueden introducir mediante mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR y el efecto en la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, se puede evaluar en ensayos apropiados *in vitro* o *in vivo*. Preferentemente, se introducen modificaciones conservativas y por lo general no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco restos en una región CDR. Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos.

Se pueden realizar modificaciones de marco en los anticuerpos para disminuir la inmunogenicidad, por ejemplo, mediante "retromutación" de uno o más restos de marco en la correspondiente secuencia de línea germinal.

Además, los anticuerpos de la divulgación se pueden someter a ingeniería para incluir modificaciones en la región Fc para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación de complemento, unión al receptor de Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, alteraciones del número de restos de cisteína en la región de bisagra para facilitar el montaje de las cadenas ligera y pesada o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo (documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.677.425); y mutaciones de aminoácidos en la región de bisagra de Fc para disminuir la semivida biológica del anticuerpo (documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.165.745).

Además, los anticuerpos de la divulgación se pueden modificar químicamente. La glicosilación de un anticuerpo se pueda alterar, por ejemplo, mediante la modificación de uno o más sitios de glicosilación en la secuencia del anticuerpo para aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno (documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.714.350 y 6.350.861). Alternativamente, para aumentar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, se pueden obtener un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de restos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras GlcNac de bisección aumentadas mediante la expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con un mecanismo de glicosilación alterado (Shields, R. L. *et al.*, 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana *et al.*, 1999 Nat. Biotech. 17:176-180).

Los anticuerpos de la divulgación se pueden pegar para aumentar la semivida biológica mediante la reacción del anticuerpo o un fragmento del mismo con polietilenglicol (PEG) o un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG llegan a unirse al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La pegilación de anticuerpos se puede llevar 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" se pretende que incluya cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como monoalcoxi (C1-C10)- o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. El anticuerpo que se pega puede ser un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para la pegilación de proteínas se conocen en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos de la presente divulgación (documentos de Patente EP 0 154 316 y EP 0 401 384).

Además, los anticuerpos se pueden modificar químicamente por conjugación o fusión de la región de unión a antígeno del anticuerpo a una 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 de Patente EP 0322094 y EP 0486525.

Los anticuerpos o los fragmentos de los mismos de la presente divulgación se pueden conjugar a un agente de diagnóstico y usarse de forma diagnóstica, por ejemplo, para monitorizar el desarrollo o el progreso de una enfermedad y determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. Algunos ejemplos de agentes de diagnóstico incluyen enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones que usan diversas tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable se puede acoplar o conjugar directamente al anticuerpo o fragmento del mismo, o indirectamente, a través de un conector usando técnicas conocidas en la técnica. Algunos ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa. Algunos ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptoavidina/biotina y avidina/biotina. Algunos 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. Algunos ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina. Algunos ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, Indio-111, Lutecio-171, Bismuto-213, Astato-211, Cobre-62, Cobre-64, Cobre-67, Itrio-90, Yodo-125, Yodo-131, Fósforo-32, Fósforo-33, Escandio-47, Plata-111, Galio-67, Praseodimio-142, Samario-153, Terbio-161, Disprosio-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, Erblio-169, Iridio-194, Oro-198, Oro-199, y Plomo-211. Los anticuerpos monoclonales se pueden conjugar indirectamente a iones radiometálicos mediante el uso de agentes quelantes difuncionales que se unen covalentemente a los anticuerpos. Los agentes quelantes se pueden unir a través de aminas (Meares *et al.*, 1984 Anal. Biochem. 142: 68-78); grupos sulfhídrico (Koyama 1994 Chem. Abstr. 120: 217262t) de restos de aminoácido y grupos carbohidrato (Rodwell *et al.* 1986 PNAS USA 83: 2632-2636; Quadri *et al.* 1993 Nucl. Med. Biol. 20: 559-570).

Además, los anticuerpos o los fragmentos de los mismos de la presente divulgación se pueden conjugar a un agente terapéutico. Los agentes terapéuticos adecuados incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiانترacina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puomicina, antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina, hidroxiaurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (como la mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazina, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino (tales como carboplatino), antibióticos (tales como dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, daunorrubicina (anteriormente daunomicina), doxorubicina, idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC)), toxina diftérica y moléculas relacionadas (tales como cadena A de difteria y fragmentos activos de la misma y moléculas híbridas), toxina ricina (tales como ricina A o toxina desglucosilada de la cadena A de ricina), toxina del cólera, una toxina de tipo Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-III), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertussis, toxina tetánica, inhibidor de la proteasa Bowman-Birk de soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modicina, gelatina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcuma, crocina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, toxinas de enomicina y toxinas mixtas.

Las moléculas conjugadas adecuadas adicionales incluyen ribonucleasa (ARNasa), ADNasa I, un ácido nucleico antisentido, una molécula de ARN inhibidora tal como una molécula de ARNsi, un ácido nucleico inmunoestimulador, aptámeros, ribozimas, moléculas formadoras de tríplex, y secuencias de guía externas. Los aptámeros son pequeños ácidos nucleicos que varían de 15 a 50 bases de longitud que se pliegan en estructuras secundarias y terciarias definidas, tales como estructuras en horquilla o cuartetos G, y pueden unir moléculas pequeñas, tales como ATP (documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.631.146) y teofilina (documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.580.737), así como moléculas grandes, tales como transcriptasa inversa (documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.786.462) y trombina (documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.543.293). Las ribozimas son moléculas de ácido nucleico que son capaces de catalizar una reacción química, ya sea intramolecular o intermolecularmente. Las ribozimas escinden por lo general sustratos de ácido nucleico a través del reconocimiento y la unión al sustrato diana con posterior escisión. Las moléculas de ácido nucleico con función formadora de tríplex pueden interactuar con ácido nucleico bicatenario o monocatenario formando un tríplex, en el que tres cadenas de ADN forman un complejo dependiente del emparejamiento de bases tanto de Watson-Crick como de Hoogsteen. Las moléculas de tríplex pueden unirse a regiones diana con alta afinidad y especificidad.

Las moléculas funcionales de ácido nucleico pueden actuar como efectores, inhibidores, moduladores y estimuladores de una actividad específica poseída por una molécula diana, o las moléculas funcionales de ácido nucleico pueden poseer una actividad nueva independiente de cualquier otra molécula. Los agentes terapéuticos se pueden unir al anticuerpo directa o indirectamente, utilizando cualquiera de un gran número de métodos disponibles. Por ejemplo, se puede unir un agente a la región de bisagra del componente de anticuerpo reducido mediante la formación de enlaces disulfuro, usando reticuladores tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinilo (SPDP), o mediante un resto de carbohidrato en la región Fc del anticuerpo (Yu *et al.* 1994 Int. J. Cancer 56: 244; Upeslaciis *et al.*, "Modification of Antibodies by Chemical Methods," en Monoclonal antibodies: principles and applications, Birch *et al.* (eds.), páginas 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," en Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application, Ritter *et al.* (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995)).

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

Los anticuerpos de la divulgación o las regiones de unión a antígeno de los mismos se pueden unir a otra molécula funcional tal como otro anticuerpo o ligando para un receptor para generar una molécula di-específica o multiespecífica que se une a al menos dos o más sitios de unión o moléculas diana diferentes. La unión del anticuerpo a una o más de otras moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, se puede realizar, 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 el segundo epítopos diana. Las moléculas di-específicas y multiespecíficas se pueden preparar usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede generar por separado cada unidad de unión de la molécula di-específica y a continuación conjugarse entre sí. Cuando las moléculas de unión son proteínas o péptidos, se puede

usar una diversidad de agentes de acoplamiento o reticulación para conjugación covalente. Algunos ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y 4-(N-maleimidometil)ciclohaxano-l-carboxilato de sulfosuccinimidilo (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 unión de sulfhidrilo de las regiones de bisagra C-terminal de las dos cadenas pesadas.

Los anticuerpos o los fragmentos de los mismos de la presente divulgación se pueden unir a un resto que es tóxico para una célula al que se une el anticuerpo para formar anticuerpos de "agotamiento". Estos anticuerpos son particularmente útiles en aplicaciones en las que se desea agotar una célula NK.

Los anticuerpos de la divulgación también se pueden unir a soportes sólidos, que 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 se pueden unir a numerosos vehículos diferentes. De ese modo, la divulgación también proporciona composiciones que contienen los anticuerpos y otra sustancia, activa o inerte. Algunos 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 divulgación. Los expertos en la materia conocerán otros vehículos adecuados para unir anticuerpos monoclonales, o podrán determinar los mismos usando experimentación rutinaria.

Aislamiento, cultivo y expansión de APC, incluyendo células dendríticas

La presente divulgación también proporciona células hospedadoras aisladas que comprenden uno o más de los polipéptidos aislados o los polinucleótidos aislados o los vectores de la presente divulgación. En un aspecto, la célula hospedadora aislada es una célula eucariota tal como una célula presentadora de antígeno (APC), por ejemplo una célula dendrítica. En otro aspecto, la célula hospedadora aislada es una célula procariota. En un aspecto, la divulgación es una célula hospedadora aislada que se cultiva en condiciones que estimulan la expresión del polinucleótido. La presente divulgación también proporciona la célula hospedadora, el sistema de expresión y el polipéptido producido por el sistema de expresión.

Lo que sigue a continuación es una descripción breve de dos enfoques fundamentales para el aislamiento de APC. Estos enfoques implican (1) aislamiento de células precursoras de médula ósea (CD34⁺) de la sangre y estimulación de las mismas para diferenciarlas en APC; o (2) recogida de las APC precomprometidas de la sangre periférica. En el primer enfoque, el paciente se debe tratar con citoquinas tales como GM-CSF para reforzar el número de células madre CD34⁺ en circulación en la sangre periférica. El segundo enfoque de aislar las APC es recoger los números relativamente elevados de APC precomprometidas que ya circulan en la sangre. Las técnicas previas para aislar las APC comprometidas de sangre periférica humana han implicado combinaciones de procedimientos físicos tales como gradientes de metrizamida y etapas de adherencia/no adherencia (Freudenthal *et al.* (1990) PNAS 87:7698-7702); separaciones en gradiente de Percoll (Mehta-Damani *et al.* (1994) J. Immunol. 153:996-1003); y técnicas de clasificación celular activadas por fluorescencia (Thomas *et al.* (1993) J. Immunol. 151:6840-52).

Una técnica para separar grandes números de células entre sí se conoce como elutriación centrífuga a contracorriente (CCE). Las células se sitúan en un rotor especial de elutriación. El rotor se hace girar a continuación a una velocidad constante, por ejemplo, de 3000 rpm. Una vez el rotor ha alcanzado la velocidad deseada, se usa aire presurizado para controlar el caudal de células. Las células en el elutriador se someten simultáneamente a centrifugación y una corriente de tampón de lavado que aumenta de caudal de forma constante. Esto da como resultado la separación fraccionada de células basada en gran medida, pero no exclusivamente, en las diferencias en el tamaño celular.

En un aspecto de la divulgación, las APC son células dendríticas precomprometidas o maduras que se han aislado de la fracción de leucocitos de un mamífero, tal como un murino, simio o un ser humano (véase, por ejemplo, el documento de Patente WO 96/23060). La fracción de leucocitos puede ser de la sangre periférica del mamífero. Este método incluye las siguientes etapas: (a) proporcionar una fracción de leucocitos obtenida de una fuente de mamífero mediante métodos conocidos en la técnica tales como leucoaféresis; (b) separar la fracción de leucocitos de la etapa (a) en cuatro o más subfracciones mediante elutriación centrífuga a contracorriente, (c) estimular la conversión de monocitos en una o más fracciones de la etapa (b) en células dendríticas poniendo en contacto las células con ionóforo de calcio, GM-CSF y IL-13 o GM-CSF e IL-4, (d) identificar la fracción enriquecida en células dendríticas de la etapa (c), y (e) recoger la fracción enriquecida de la etapa (d), preferentemente a aproximadamente 4 °C. Una forma de identificar la fracción enriquecida en células dendríticas es mediante clasificación celular activada por fluorescencia. La fracción de leucocitos se puede tratar con ionóforo de calcio en presencia de otras citoquinas, tales como rhIL-12, rhGM-CSF, o rhIL-4 recombinantes (rh). Las células de la fracción de leucocitos se pueden lavar en tampón y suspender en medio exento de Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ antes de la etapa de separación. La fracción de leucocitos se puede obtener mediante leucoaféresis. Las células dendríticas se pueden identificar por la presencia de al menos

uno de los siguientes marcadores HLA-DR, HLA-DQ, o B7.2, y la ausencia simultánea de los siguientes marcadores: CD3, CD16, CD56, CD57, y CD19, CD20. Los anticuerpos monoclonales específicos frente a estos marcadores de la superficie celular están disponibles en el mercado.

Más específicamente, el método requiere recoger una recogida enriquecida de leucocitos y plaquetas de leucoaféresis que a continuación se fracciona adicionalmente mediante elutriación centrífuga a contracorriente (CCE) (Abrahamsen *et al.* (1991) J. Clin. Apheresis. 6:48-53). En esta técnica, las células se someten simultáneamente a centrifugación y una corriente de tampón de lavado que aumenta de caudal de forma constante. El flujo a contracorriente constantemente creciente de tampón conduce a la separación fraccionada de las células que se basa en gran medida en el tamaño celular.

El control de calidad de APC y más específicamente la recogida de DC y la confirmación de su activación con éxito en cultivo depende de una técnica de análisis simultáneo por FACS con múltiples colores que monitoriza tanto los monocitos como la subpoblación de las células dendríticas así como los posibles linfocitos T contaminantes. La clasificación celular se basa en la expresión diferencial de marcadores de la superficie celular que incluyen CD3 (linfocitos T), CD16/CD56/CD57 (linfocitos NK/LAK), y CD19/CD20 (linfocitos B). Las DC son distinguibles de los monocitos basándose en parte en los niveles de CD14, que se expresa a niveles muy altos en monocitos en comparación con las DC. Las DC muestran altos niveles de expresión de HLA-DR, HLA-DQ significativo y B7.2 (pero poco o nada de B7.1) en el momento en que están circulando en la sangre (además, expresan Leu M7 y M9, marcadores mieloides que también se expresan en monocitos y neutrófilos).

Cuando se combina con un reactivo de tercer color para análisis de células muertas, yoduro de propidio (PI), es posible realizar la identificación positiva de todas las subpoblaciones celulares.

El objetivo del análisis por FACS en el momento de la recogida es confirmar que las DC están enriquecidas en las fracciones esperadas, para monitorizar la contaminación de neutrófilos, y para estar seguros de que se expresan los marcadores apropiados. Esta rápida recogida en masa de las DC enriquecidas de la sangre periférica humana, adecuada para aplicaciones clínicas, es absolutamente dependiente de la técnica analítica de FACS descrita anteriormente para control de calidad. Si fuera necesario, las DC maduras se pueden separar inmediatamente de los monocitos en este punto mediante clasificación fluorescente para las células "negativas al cóctel". Puede no ser necesario separar de forma rutinaria las DC de los monocitos debido a que los propios monocitos aún son capaces de diferenciarse en las DC o en células funcionales de tipo DC en cultivo.

Una vez recogidas, las fracciones de APC ricas en DC/monocitos (habitualmente de 150 a 190) se pueden combinar y conservar criogénicamente para uso futuro, o poner inmediatamente en cultivo a corto plazo.

Alternativamente, otros han informado un método para regular positivamente (activar) células dendríticas y convertir monocitos en un fenotipo celular dendrítico activado. Este método implica la adición de ionóforo de calcio al medio celular para convertir los monocitos en células dendríticas activadas. La adición del ionóforo de calcio A23187, por ejemplo, al principio de un período de cultivo de 24-48 horas dio como resultado la activación uniforme y la conversión al fenotipo de células dendríticas de las fracciones "monocitos más DC" combinadas: de forma característica, la población activada se vuelve uniformemente CD14 (Leu M3) negativa, y regula positivamente HLA-DR, HLA-DQ, ICAM-1, B7.1, y B7.2. Además, esta población en masa activada funciona también a pequeña escala purificada adicionalmente.

La combinación o combinaciones específicas de citoquinas se han usado con éxito para amplificar (o sustituir parcialmente) la activación/conversión conseguida con ionóforo de calcio: estas citoquinas incluyen, pero no se limitan a, rhGM-CSF, rhIL-2, y rhIL-4 purificadas o recombinantes ("rh"). Cada citoquina, cuando se administra sola, no es adecuada para regulación positiva óptima.

Presentación de antígeno al APC

Con fines de inmunización, los polipéptidos (por ejemplo, las SEQ ID NOS: 1 a 33) se pueden suministrar a células presentadoras de antígeno como proteína/péptido o en forma de ADNc que codifica la proteína/péptido. Las células presentadoras de antígeno (APC) pueden consistir en células dendríticas (DC), monocitos/macrófagos, linfocitos B u otro tipo o tipos de células que expresan las moléculas MHC/coestimuladoras necesarias. Los métodos descritos posteriormente se centran principalmente en las DC que son las APC más potentes y preferentes.

La pulsación se consigue *in vitro/ex vivo* mediante exposición de las APC a una proteína antigénica o un polipéptido o polipéptidos de la presente divulgación. La proteína o el péptido o péptidos se añaden a las APC a una concentración de 1-10 μ M durante aproximadamente 3 horas. La transfección de las APC con los polinucleótidos que codifican antígenos o polipéptidos antigénicos se consigue exponiendo las APC a ácidos nucleicos en presencia de agentes de transfección conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, lípidos catiónicos. Las APC transfectadas o pulsadas se pueden administrar posteriormente al hospedador mediante una ruta de suministro intravenosa, subcutánea, intranasal, intramuscular o intraperitoneal.

El antígeno de proteína/péptido también se puede suministrar *in vivo* con adyuvante mediante una ruta de suministro intravenosa, subcutánea, intranasal, intramuscular o intraperitoneal.

Células presentadoras de antígeno de Foster

Las células presentadoras de antígeno de Foster son particularmente útiles como célula diana. Las APC de Foster se obtienen a partir de la línea celular humana 174X CEM.T2, denominada T2, que contiene una mutación en su ruta de procesamiento de antígeno que restringe la asociación de péptidos endógenos con moléculas de clase I de MHC de superficie celular (Zweerink *et al.* (1993) J. Immunol. 150:1763-1771). Esto se debe a una gran delección homocigótica de la región de clase II de MHC que incluye los genes TAP 1, TAP2, LMP 1, y LMP2, que se requieren para la presentación de antígeno a los CTL CD8⁺ restringidos de clase I de MHC. En efecto, solo se presentan moléculas de clase I de MHC "vacías" en la superficie de estas células. El péptido exógeno añadido al medio de cultivo se une a estas moléculas de MHC siempre que el péptido contenga el motivo de unión específico de alelo. Estas células T2 se denominan en el presente documento APC de "Foster". Se pueden usar junto con la presente divulgación para presentar un antígeno o antígenos.

La transducción de células T2 con alelos de MHC recombinantes específicos permite la redirección del perfil de restricción de MHC. Las bibliotecas adaptadas a medida al alelo recombinante se presentarán preferentemente en los mismos debido a que los restos de anclaje evitarán la unión eficaz al alelo endógeno.

La expresión a alto nivel de moléculas de MHC hace la APC más visible a los CTL. La expresión del alelo de MHC de interés en las células T2 usando un potente promotor transcripcional (por ejemplo, el promotor de CMV) da como resultado una APC más reactiva (debido con la mayor probabilidad a una mayor concentración de complejos MHC-péptido reactivos en la superficie celular).

Expansión de células efectoras inmunes

La presente divulgación hace uso de estas APC para estimular la producción de una población enriquecida de células efectoras inmunes específicas de antígeno. Las células efectoras inmunes específicas de antígeno se expanden a expensas de las APC, que mueren en el cultivo. El proceso mediante el que las células efectoras inmunes sin comprometer se educan por otras células se describe básicamente en Coulie (1997) Molec. Med. Today 3:261-268.

Las APC preparadas como se ha descrito anteriormente se mezclan con células efectoras inmunes sin comprometer. Preferentemente, las células se pueden cultivar en presencia de una citoquina, por ejemplo IL2. Debido a que las células dendríticas segregan citoquinas inmunoestimuladoras potentes, tales como IL12, puede no ser necesario añadir citoquinas complementarias durante la primera y sucesivas rondas de expansión. En cualquier caso, las condiciones de cultivo son tales que las células efectoras inmunes específicas de antígeno se expanden (es decir, proliferan) a una velocidad mucho mayor que las APC. Se pueden llevar a cabo múltiples infusiones de APC y citoquinas opcionales para expandir aún más la población de células específicas de antígeno.

En una realización, las células efectoras inmunes son linfocitos T. En una realización distinta, las células efectoras inmunes se pueden modificar genéticamente por transducción con un transgén que codifica, por ejemplo, IL-2, IL-11 o IL-13. Los métodos para introducir transgenes *in vivo*, *ex vivo* e *in vivo* se conocen en la técnica.

Análisis funcional con anticuerpos

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden usar para purificar los polipéptidos de la presente divulgación y para identificar polipéptidos y/o polinucleótidos biológicamente equivalentes. También se pueden usar para identificar agentes que modifican la función de los polipéptidos de la presente divulgación. Estos anticuerpos incluyen antisueros policlonales, anticuerpos monoclonales, y diversos reactivos obtenidos a partir de estas preparaciones que son familiares para los expertos en la materia y que se han descrito anteriormente. Los anticuerpos que neutralizan las actividades de proteínas codificadas por los genes identificados también se pueden usar *in vivo* o *in vitro* para demostrar función por adición de tales anticuerpos neutralizadores a sistemas de ensayo *in vivo* e *in vitro*. También son útiles como agentes farmacéuticos para modular la actividad de polipéptidos de la divulgación.

También se pueden usar diversas preparaciones de anticuerpo en métodos analíticos tales como ensayos de ELISA o transferencias de Western para demostrar la expresión de proteínas codificadas por los genes identificados mediante las células de ensayo *in vitro* o *in vivo*. También se pueden identificar fragmentos de tales proteínas generados mediante degradación con proteasas durante el metabolismo mediante el uso de antisueros policlonales apropiados con muestras obtenidas a partir de muestras experimentales.

Los anticuerpos de la divulgación se pueden usar para vacunación o para vacunación de refuerzo, solos o en combinación con péptidos o vacunas basadas en proteínas o vacunas basadas en células dendríticas.

Composiciones

Además, se proporcionan composiciones. Las composiciones comprenden un vehículo y uno o más de un polipéptido aislado de la divulgación, un polinucleótido aislado de la divulgación, un vector de la divulgación, una célula hospedadora aislada de la divulgación, una molécula pequeña o un anticuerpo de la divulgación. Los vehículos pueden ser uno o más de un soporte sólido o un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden comprender además un adyuvante u otros componentes adecuados para administración como vacunas. En un aspecto, las composiciones se formulan con uno o más excipientes, diluyentes, vehículos y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Además, las realizaciones de las composiciones de la presente divulgación incluyen uno o más de un polipéptido aislado de la divulgación, un polinucleótido aislado de la divulgación, un vector de la divulgación, una molécula pequeña, una célula hospedadora aislada de la divulgación, o un anticuerpo de la divulgación, formulados con una o más sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables.

Para preparaciones orales, se pueden usar uno cualquiera o más de un polipéptido aislado o recombinante como se describe en el presente documento, un polinucleótido aislado o recombinante como se describe en el presente documento, un vector como se describe en el presente documento, una célula hospedadora aislada como se describe en el presente documento, una molécula pequeña o un anticuerpo como se describe en el presente documento, solos o en formulaciones farmacéuticas de la invención que comprenden, o que consisten básicamente en, el compuesto en combinación con aditivos apropiados para preparar comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábica, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y, si se desea, con diluyentes, agentes de tamponamiento, agentes hidratantes, conservantes y agentes aromatizantes. Se pueden incluir agentes de unión y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos 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 disgregante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un agente de deslizamiento 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 aromatizante de naranja.

Las formulaciones farmacéuticas y las formas de dosificación unitaria adecuadas para administración oral son particularmente útiles en el tratamiento de afecciones crónicas, infecciones, y terapias en las que el paciente se autoadministra el fármaco. En un aspecto, la formulación es específica para administración pediátrica.

La divulgación proporciona formulaciones farmacéuticas en las que los uno o más de un polipéptido aislado de la divulgación, un polinucleótido aislado de la divulgación, un vector de la divulgación, una célula hospedadora aislada de la divulgación, o un anticuerpo de la divulgación se pueden formular en preparaciones para inyección de acuerdo con la divulgación por disolución, suspensión o emulsión de los mismos en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros aceites similares, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y, si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulgentes, estabilizantes y conservantes u otros agentes antimicrobianos. Un ejemplo no limitante de los mismos es un agente antimicrobiano tal como otros componentes de vacuna tales como antígenos superficiales, por ejemplo OMP P5, rsPilA, OMP 26, OMP P2, o proteína Pilina de Tipo IV (véanse Jurgisek y Bakaletz (2007) J. of Bacteriology 189(10):3868-3875 y Murphy, TF, Bakaletz, LO y Smeesters, PR (2009) The Pediatric Infectious Disease Journal, 28:S121-S126) y agentes antibacterianos. Para administración intravenosa, los vehículos 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 debería ser fluida en la medida que pueda exhibir una fácil manipulación con jeringa.

Las formulaciones de aerosol provistas por la divulgación se pueden administrar mediante inhalación y pueden basarse o no basarse en un propelente. Por ejemplo, las realizaciones de las formulaciones farmacéuticas de la divulgación comprenden un compuesto de la divulgación formulado en propelentes aceptables presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similar. Para administración por inhalación, los compuestos se pueden suministrar en forma de una pulverización de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. Un ejemplo no limitante de una sustancia que no es un propelente es una pulverización de bomba que se expulsa desde un recipiente cerrado por medio de fuerza mecánica (es decir, empujando un pistón con el dedo o por compresión del recipiente, tal como mediante una fuerza compresiva aplicada a la pared del recipiente o una fuerza elástica ejercida por la propia pared (por ejemplo, mediante una vejiga elástica)).

Los supositorios de la divulgación se pueden preparar por mezcla de un compuesto de la divulgación con cualquiera de una diversidad de bases tales como bases emulgentes o bases solubles en agua. Las realizaciones de esta formulación farmacéutica de un compuesto de la divulgación se pueden administrar por vía rectal mediante un

supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, Carbowax, y polietilenglicoles, que se funden a la temperatura corporal, pero solidifican a la temperatura ambiente.

Se pueden proporcionar formas de dosificación unitaria para administración oral o rectal, tales como jarabes, elixires, y suspensiones, en las que cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharadita, cucharada, comprimido o supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más compuestos de la divulgación. Del mismo modo, las formas de dosificación unitaria para inyección o administración intravenosa pueden comprender un compuesto de la divulgación en una composición en forma de una solución en agua estéril, solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las realizaciones de las formulaciones farmacéuticas de la divulgación incluyen aquellas en las que uno o más de un polipéptido aislado de la divulgación, un polinucleótido aislado de la divulgación, un vector de la divulgación, una molécula pequeña para su uso en la divulgación, una célula hospedadora aislada de la divulgación, o un anticuerpo de la divulgación se formula en una composición inyectable. Las formulaciones farmacéuticas inyectables de la divulgación se preparan en forma de soluciones o suspensiones líquidas; o en formas sólidas adecuadas para disolución, o suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar o el ingrediente activo encapsular en vehículos de liposomas de acuerdo con otras realizaciones de las formulaciones farmacéuticas de la divulgación.

En una realización, uno o más de un polipéptido aislado de la divulgación, un polinucleótido aislado de la divulgación, un vector de la divulgación, una célula hospedadora aislada de la divulgación, o un anticuerpo de la divulgación se formula para el suministro mediante un sistema de suministro continuo. La expresión "sistema de suministro continuo" se usa de forma intercambiable en el presente documento con "sistema de suministro controlado" e incluye sistemas de suministro (por ejemplo, bombas) continuos (por ejemplo, controlados) en combinación con catéteres, dispositivos de inyección, y similares, una amplia diversidad de los cuales se conocen la técnica.

También pueden ser adecuadas bombas de infusión mecánicas o electromecánicas para su uso con la presente divulgación. Algunos ejemplos de tales dispositivos incluyen los descritos, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 4.692.147; 4.360.019; 4.487.603; 4.360.019; 4.725.852; 5.820.589; 5.643.207; 6.198.966; y similares. En general, el suministro de un compuesto de la divulgación se puede conseguir usando cualquiera de una diversidad de sistemas de bomba rellenables. Las bombas proporcionan liberación consistente y controlada a lo largo del tiempo. En algunas realizaciones, un compuesto de la divulgación está en una formulación líquida en un depósito impermeable a fármaco, y se suministra de forma continua al individuo

En una realización, el sistema de suministro de fármaco está en un dispositivo al menos parcialmente implantable. El dispositivo implantable se puede implantar en cualquier sitio de implantación adecuado usando métodos y dispositivos bien conocidos en la técnica. Un sitio de implantación es un sitio en el cuerpo de un sujeto en el que se introduce y sitúa un dispositivo de suministro de fármaco. Los sitios de implantación incluyen, pero no se limitan necesariamente a, un sitio subdérmico, subcutáneo, intramuscular, u otro sitio adecuado en el cuerpo del sujeto. Los sitios de implantación subcutáneos se usan en algunas realizaciones debido a la conveniencia de la implantación y la retirada del dispositivo de suministro de fármaco.

Los dispositivos de liberación de fármaco adecuados para su uso en la divulgación se pueden basar en cualquiera de una diversidad de modos de operación. Por ejemplo, el dispositivo de liberación de fármaco se puede basar en un sistema de difusión, o un sistema convectivo, o un sistema erosionado (por ejemplo, un sistema basado en erosión). Por ejemplo, el dispositivo de liberación de fármaco puede ser una bomba electroquímica, bomba osmótica, una bomba electroosmótica, una bomba de presión de vapor, o una matriz de estallido osmótico, por ejemplo, en el que el fármaco se incorpora a un polímero y el polímero proporciona la liberación de la formulación de fármaco de forma simultánea con la degradación de un material polimérico impregnado de fármaco (por ejemplo, un material polimérico impregnado de fármaco, biodegradable). En otras realizaciones, el dispositivo de liberación de fármaco se basa en un sistema de electrodifusión, una bomba electrolítica, una bomba efervescente, una bomba piezoeléctrica, un sistema hidrolítico, etc.

Los dispositivos de liberación de fármaco basados en una bomba de infusión mecánica o electromecánica también pueden ser adecuados para su uso con la presente divulgación. Algunos ejemplos de tales dispositivos incluyen los descritos, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 4.692.147; 4.360.019; 4.487.603; 4.360.019; 4.725.852, y similares. En general, un método de tratamiento de un sujeto se puede conseguir usando cualquiera de una diversidad de sistemas de bomba no intercambiables y rellenables. Las bombas y otros sistemas convectivos son generalmente preferentes debido a su liberación controlada generalmente más consistente a lo largo del tiempo. Se usan bombas osmóticas en algunas realizaciones debido a sus ventajas combinadas de liberación controlada más consistente y tamaño relativamente pequeño (véanse, por ejemplo, el documento de solicitud publicada PCT N.º WO 97/27840 y los documentos de Patente de Estados Unidos con números 5.985.305 y 5.728.396). Algunos dispositivos impulsados osmóticamente a modo de ejemplo adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen, pero no se limitan necesariamente a, los descritos en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 3.760.984; 3.845.770; 3.916.899; 3.923.426; 3.987.790; 3.995.631; 3.916.899;

4.016.880; 4.036.228; 4.111.202; 4.111.203; 4.203.440; 4.203.442; 4.210.139; 4.327.725; 4.627.850; 4.865.845; 5.057.318; 5.059.423; 5.112.614; 5.137.727; 5.234.692; 5.234.693; 5.728.396; y similares. Un dispositivo a modo de ejemplo adicional que se puede adaptar para la presente divulgación es la bomba de infusión Synchromed (Medtronic).

En algunas realizaciones, el dispositivo de suministro de fármaco es un dispositivo implantable. El dispositivo de suministro de fármaco se puede implantar en cualquier sitio de implantación adecuado usando métodos y dispositivos bien conocidos en la técnica. Como se indica en el presente documento, un sitio de implantación es un sitio en el cuerpo de un sujeto en el que se introduce y sitúa un dispositivo de suministro de fármaco. Los sitios de implantación incluyen, pero no se limitan necesariamente a, un sitio subdérmico, subcutáneo, intramuscular, u otro sitio en el cuerpo de un sujeto.

Los vehículos y excipientes adecuados para una composición de la divulgación son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares, y las combinaciones de los mismos. Además, si se desea, el vehículo puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes de humectación o emulsión o agentes de tamponamiento de pH. Los métodos de preparación de tales formas de dosificación se conocen, o serán evidentes tras la consideración de la presente divulgación, por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 17^a edición, 1985. La composición o formulación que se administra contendrá, en cualquier caso, una cantidad del compuesto adecuada para conseguir el estado deseado en el sujeto que se trata.

Las composiciones de la presente divulgación incluyen las que comprenden una matriz de liberación sostenida o de liberación controlada. Además, las realizaciones de la presente divulgación se pueden usar junto con otros tratamientos que usan formulaciones de liberación sostenida. Como se usa en el presente documento, una matriz de liberación sostenida es una matriz hecha de materiales, habitualmente polímeros, que son degradables por hidrólisis enzimática o basada en ácidos o por disolución. Una vez insertada en el cuerpo, la matriz se acciona mediante enzimas y fluidos corporales. Una matriz de liberación sostenida se selecciona de forma deseable entre materiales biocompatibles tales como liposomas, polilactidas (ácido poliláctico), poliglicólido (polímero de ácido glicólico), polilactida co-glicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinil propileno, polivinilpirrolidona y silicona. Algunas matrices biodegradables ilustrativas incluyen una matriz de polilactida, una matriz de poliglicólido, y una matriz de polilactida co-glicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

En otra realización, el agente interferente (así como las composiciones de combinación) se suministra en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, un compuesto de la divulgación se puede administrar usando infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas, u otros modos de administración. En una realización, se puede usar una bomba (Sefton (1987) CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald *et al.* (1980) Surgery 88:507; Saudek *et al.* (1989) N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, se usan materiales poliméricos. En otra realización más, se sitúa un sistema de liberación controlada en la proximidad del agente terapéutico, es decir, el hígado, requiriendo de ese modo solo una fracción de la dosis sistémica. En otra realización más, se sitúa un sistema de liberación controlada en la proximidad de la diana terapéutica, requiriendo de ese modo solo una fracción de la dosis sistémica. Se discuten otros sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer (1990) Science 249:1527-1533.

En otra realización, las composiciones de la presente divulgación (así como las composiciones de combinación separada o conjuntamente) incluyen las formadas por impregnación de un agente inhibidor descrito en el presente documento en materiales de absorción, tales como suturas, vendas, y gasas, o revestidos sobre la superficie de materiales de fase sólida, tales como grapas quirúrgicas, cremalleras y catéteres para suministrar las composiciones. Otros sistemas de suministro de este tipo serán muy evidentes para los expertos en la materia en vista de la presente divulgación.

La presente divulgación proporciona métodos y composiciones para la administración de uno o más de un agente interferente a un hospedador (por ejemplo, un ser humano) para el tratamiento de una infección microbiana. En diversas realizaciones, estos métodos de la divulgación abarcan casi cualquier método disponible y ruta adecuada para suministro de fármaco, incluyendo métodos *in vivo* y *ex vivo*, así como rutas de administración sistémicas y localizadas.

Ensayos de análisis sistemático

La presente divulgación proporciona métodos para analizar sistemáticamente agentes equivalentes, tales como anticuerpos monoclonales equivalentes a un anticuerpo policlonal como se describe en el presente documento y diversos agentes que modulan la actividad de los agentes activos y las composiciones farmacéuticas de la divulgación o la función de un producto de polipéptido o péptido codificado por el polinucleótido de la presente divulgación. Para los fines de la presente divulgación, se pretende que un "agente" incluya, pero no se limite a, un

compuesto biológico o químico tal como una molécula simple o compleja, orgánica o inorgánica, un péptido, una proteína (por ejemplo, anticuerpo), un polinucleótido (por ejemplo, antisentido) o una ribozima. Se puede sintetizar un amplio conjunto de compuestos, por ejemplo polímeros, tales como polipéptidos y polinucleótidos, y compuestos orgánicos sintéticos basándose en diversas estructuras centrales, y esos también se incluyen en el término "agente".

5 Además, diversas fuentes naturales pueden proporcionar compuestos para análisis sistemático, tales como extractos de plantas o animales, y similares. Se ha de entender que, aunque no siempre se indique explícitamente, el agente se usa solo o en combinación con otro agente, que tenga la misma o diferente actividad biológica que los agentes identificados por el análisis sistemático de la invención.

10 Una realización es un método para analizar sistemáticamente agentes capaces de interactuar con, unirse a, o inhibir la interacción ADN-DNABII (por ejemplo, IHF). La presente divulgación proporciona en la Figura 6B la estructura tridimensional del ADN microbiano e IHF. Por lo tanto, la divulgación permite el uso de técnicas de diseño virtual, también conocidas como ayudadas por computadora, en el diseño o modelado por computadora, para diseñar, seleccionar, y sintetizar agentes capaces de interactuar con, unirse a, o inhibir la interacción ADN-DNABII (por
15 ejemplo, IHF). A su vez, los agentes candidatos pueden ser eficaces en el tratamiento de biopelículas y enfermedades o afecciones asociadas (médicas, industriales o veterinarias) como se describe en el presente documento. De ese modo, la presente divulgación también proporciona agentes identificados o diseñados mediante los métodos por computadora.

20 La estructura tridimensional de un complejo IHF-ADN se ilustra en la Figura 6B y se proporciona una estructura representativa, con coordenadas X, Y y Z, en el banco de datos Protein Data Bank, Número de Acceso: 1IHF, con los detalles pertinentes proporcionados en Rice *et al.* Cell 87:1295-1306 (1996). La estructura tridimensional de la proteína IHF en el complejo IHF-ADN se puede usar para el método de análisis sistemático. Un agente adecuado es el que se puede situar con respecto a la estructura de la proteína IHF en el complejo IHF-ADN con interacciones de
25 al menos uno, o alternativamente dos, o tres, o cuatro, o cinco, o seis, o siete, o ocho, o nueve, o al menos diez de los restos de aminoácido que se identifican que están implicados en la interacción con ADN.

La Figura 6A ilustra los restos de aminoácido implicados en la interacción IHF-ADN, usando la secuencia de IHF de *E. coli* (SEQ ID NO: 42) como ejemplo. Tales restos de aminoácido, indicados por el nivel inferior de las flechas en la
30 Figura 6A, se describen adicionalmente a continuación, indicados con letras en negrita y subrayadas. En concreto, con el IHF de *E. coli*, los aminoácidos implicados en la unión a ADN son T4, K5, A6, E28, Q43, K45, S47, G48, N51, R55, K57, R60, R63, N64, P65, K66, R76, T80, R82 o Q85.

MAL**TKA****EMSE YLFDKLG****LSK** **RD****AKEL****VELF FEEIRRALEN GE****QVKLS****GFG** **NFD****LRD****KNQR**
35 **PGR****NP****KT****GED IPITAR****RVVT** **FR****PG****OK****LKSR VENASPKDE (SEQ ID NO: 42)**

De ese modo, una realización de la presente divulgación proporciona un método implementado por computadora para identificar un agente que inhibe, compite o valora la unión de un polipéptido o una proteína DNABII a un ADN microbiano, que inhibe, previene o descompone una biopelícula microbiana, que inhibe, previene o descompone una
40 película en un sujeto, o que inhibe, previene o trata una infección microbiana que produce una biopelícula en un sujeto, que comprende situar una estructura tridimensional de un agente candidato frente a una estructura tridimensional de una proteína de factor de integración del hospedador (IHF), en el que la estructura tridimensional de la proteína de IHF se basa en coordenadas de estructura atómica X, Y y Z determinadas a partir de una forma cristalina de un complejo de IHF y ADN, en el que la interacción del agente con el IHF en dos o más aminoácidos de
45 IHF seleccionados entre T4, K5, A6, E28, Q43, K45, S47, G48, N51, R55, K57, R60, R63, N64, P65, K66, R76, T80, R82 o Q85 como se representa en la SEQ ID NO: 42, o el equivalente de cada uno, identifica que el agente inhibe, compite o valora la unión de un polipéptido o una proteína DNABII a un ADN microbiano, inhibe, previene o descompone una biopelícula microbiana, inhibe, previene o descompone una biopelícula, o inhibe, previene o trata una infección microbiana que produce una biopelícula.

50 En un aspecto, un agente candidato interactúa con la proteína de IHF en al menos uno, o dos, o tres de los aminoácidos 63, 64, 65, o 66. En un aspecto, un agente candidato interactúa con la proteína de IHF en al menos uno, o dos, o tres de R63, N64, P65, K66. En otro aspecto, un agente candidato interactúa con la proteína de IHF en al menos uno de 63 o 66. En otro aspecto, un agente candidato interactúa con la proteína de IHF en al menos uno de R63 o K66.

55 Se ha de entender en la técnica que las ubicaciones exactas y los restos de aminoácido varían dependiendo de la secuencia de IHF. Sin embargo, el experto en la materia puede identificar con facilidad tales ubicaciones y restos de aminoácido basándose en las secuencias. Por ejemplo, una secuencia de IHF se puede alinear con la secuencia de IHF de *E. coli* (SEQ ID NO: 42), como se ilustra en la Tabla 9, para revelar los que corresponden a los aminoácidos
60 en IHF de *E. coli* que interactúan con ADN. Del mismo modo, la estructura tridimensional de tal secuencia de IHF en un complejo IHF-ADN se puede usar para el análisis sistemático.

Además de los métodos implementados por computadora que se proporcionan en el presente documento, la

presente divulgación también proporciona un sistema de computadora a medida que incluye, por ejemplo, procesador, memoria y/o programa, para llevar a cabo los métodos, así como un medio legible por computadora, tal como un medio legible por computadora no transitorio que almacena un programa o código de computadora adecuado para llevar a cabo los métodos.

5

Por consiguiente, otra realización proporciona un aparato de computación a medida que comprende:

al menos un procesador;

una memoria acoplada a al menos un procesador;

un medio de almacenamiento en comunicación con la memoria y el al menos un procesador, conteniendo el medio de almacenamiento un conjunto de instrucciones ejecutables por el procesador que, cuando se ejecutan por parte del procesador configuran el aparato de computación a medida para identificar un agente que inhibe, compite o valora la unión de un polipéptido o una proteína DNABII a un ADN microbiano, que inhibe, previene o descompone una biopelícula microbiana, que inhibe, previene o descompone una biopelícula en un sujeto, o que inhibe, previene o trata una infección microbiana que produce una biopelícula en un sujeto, en el que la configuración comprende:

15

situar una estructura tridimensional de un agente candidato frente a una estructura tridimensional de una proteína de factor de integración del hospedador (IHF), en el que la estructura tridimensional de la proteína de IHF se basa en coordenadas de estructura atómica X, Y y Z determinadas a partir de una forma cristalina de un complejo de IHF y ADN, en el que la interacción del agente con el IHF en dos o más aminoácidos de IHF seleccionados entre T4, K5, A6, E28, Q43, K45, S47, G48, N51, R55, K57, R60, R63, N64, P65, K66, R76, T80, R82 o Q85 como se representa en la SEQ ID NO: 42, o el equivalente de cada uno, identifica que el agente inhibe, compite o valora la unión de un polipéptido o una proteína DNABII a un ADN microbiano, inhibe, previene o descompone una biopelícula microbiana, inhibe, previene o descompone una biopelícula, o inhibe, previene o trata una infección microbiana que produce una biopelícula.

20

25

Otra realización más proporciona un medio de computadora no transitorio que comprende un conjunto de instrucciones ejecutables por procesador que, cuando se ejecutan por parte de un procesador, identifican un agente que inhibe, compite o valora la unión de un polipéptido o una proteína DNABII a un ADN microbiano, que inhibe, previene o descompone una película microbiana, que inhibe, previene o descompone una biopelícula en un sujeto, o que inhibe, previene o trata una infección microbiana que produce una biopelícula en un sujeto, que comprende

30

situar una estructura tridimensional de un agente candidato frente a una estructura tridimensional de una proteína de factor de integración del hospedador (IHF), en el que la estructura tridimensional de la proteína de IHF se basa en coordenadas de estructura atómica X, Y y Z determinadas a partir de una forma cristalina de un complejo de IHF y ADN, en el que la interacción del agente con el IHF en dos o más aminoácidos de IHF seleccionados entre T4, K5, A6, E28, Q43, K45, S47, G48, N51, R55, K57, R60, R63, N64, P65, K66, R76, T80, R82 o Q85 como se representa en la SEQ ID NO: 42, o el equivalente de cada uno, identifica que el agente inhibe, compite o valora la unión de un polipéptido o una proteína DNABII a un ADN microbiano, inhibe, previene o descompone una biopelícula microbiana, inhibe, previene o descompone una biopelícula, o inhibe, previene o trata una infección microbiana que produce una biopelícula.

35

40

Los métodos de diseño de moléculas o fármacos por computadora se conocen bien en la técnica, véase, en términos generales, Kapetanovic (2008) Chem Biol. Interact., 171(2):165-76. En resumen, las coordenadas atómicas de la estructura tridimensional se introducen en una computadora de un modo tal que se muestren imágenes de la estructura y diversos parámetros en el medio de visualización. El diseño implica por lo general situar una estructura tridimensional en la estructura tridimensional de la molécula diana. La situación se puede controlar por parte del usuario con ayuda de una interfaz gráfica de la computadora, y se puede guiar además mediante un algoritmo de computadora buscando buenas coincidencias potenciales. La situación también implica mover cualquiera de las dos o ambas estructuras tridimensionales alrededor de cualquier dimensión.

45

50

De ese modo, los datos resultantes se introducen en un compuesto virtual y/o biblioteca de agentes. Dado que está contenida una biblioteca virtual en un software de análisis sistemático virtual tal como DOCK-4 (Kuntz, UCSF), los datos descritos anteriormente se pueden introducir en tal software. Los agentes candidatos se pueden buscar usando una base de datos de estructuras tridimensionales de compuestos candidatos a fármaco virtuales o no virtuales, tales como MDDR (Prous Science, España).

55

Se descubre que un agente candidato es capaz de unirse a ADN y/o proteína DNABII si se descubre una interacción deseada entre el agente candidato y cualquiera de los dos o ambos. La interacción puede ser cuantitativa, por ejemplo, fuerza de interacción y/o número de sitios de interacción, o cualitativa, por ejemplo, interacción o falta de interacción. Por consiguiente, el resultado del método puede ser cuantitativo o cualitativo. Por lo tanto, en un aspecto, la presente divulgación también proporciona un método para identificar un agente que no inhibe la interacción o, alternativamente, fortalece la interacción entre el ADN y la proteína.

60

El efecto inhibitorio o de unión potencial (es decir, la interacción o asociación) de un agente tal como un compuesto de molécula pequeña se puede analizar antes de su síntesis real y someter a ensayo mediante el uso de técnicas de modelado por computadora. Si la estructura teórica de un compuesto dado sugiere una interacción o asociación insuficiente entre el mismo y el ADN microbiano en la biopelícula y/o la proteína DNABII, se pueden obviar la síntesis y el ensayo del agente. Sin embargo, si el modelado por computadora indica una interacción fuerte, el agente se

65

puede sintetizar a continuación y someter a ensayo para su capacidad de unión o inhibición de la interacción usando diversos métodos tales como experimentos *in vitro* o *in vivo*. En el presente documento se desvelan métodos para someter a ensayo la capacidad de un agente para inhibir o valorar una biopelícula, solos o junto con otro agente. De esta forma, se puede obviar la síntesis de agentes y compuestos no operativos.

El experto en la materia puede usar cualquiera de varios métodos para analizar sistemáticamente entidades químicas o biológicas o fragmentos para su capacidad para asociarse con DNABII o ADN microbiano y más particularmente con los sitios de unión específicos. A continuación, los fragmentos o entidades químicas seleccionados se pueden situar en una diversidad de orientaciones, o acoplar, en un sitio de unión individual de ADN o polipéptido DNABII. El acoplamiento se puede conseguir usando software tal como QUANTA, SYBYL, seguido de minimización de energía y dinámica molecular con fuerzas de campo de mecánica molecular estándar, tales como CHARMM y AMBER.

También están disponibles programas de computadora comerciales para el diseño por computadora. Algunos ejemplos incluyen, sin limitación, GRID (Oxford University, Oxford, UK), MCSS (Molecular Simulations, Burlington, Mass.), AUTODOCK (Scripps Research Institute, La Jolla, Calif.), DOCK (University of California, San Francisco, Calif.), GLIDE (Schrodinger Inc.), FlexX (Tripos Inc.) y GOLD (Cambridge Crystallographic Data Centre).

Una vez se ha diseñado o seleccionado un agente o compuesto mediante los métodos anteriores, se puede someter a ensayo y optimizar la eficacia con la que ese agente o compuesto se puede unir a cualquier otro mediante evaluación computacional. Por ejemplo, un fragmento de DNABII eficaz o puede demostrar preferentemente una diferencia relativamente pequeña en energía entre sus estados unido y libre (es decir, una baja energía de deformación de unión).

Un compuesto diseñado o seleccionado se puede optimizar adicionalmente de forma computacional de un modo tal que en su estado unido carecería preferentemente de interacciones electrostáticas o repulsivas con la proteína diana. Tales interacciones no complementarias (por ejemplo, electrostáticas) incluyen interacciones repulsivas carga-carga, dipolo-dipolo, y carga-dipolo. Específicamente, la suma de todas las interacciones electrostáticas entre el agente y DNABII y/o ADN microbiano en la biopelícula cuando el agente o compuesto está unido a cualquier otro agente, hacen preferentemente una contribución neutra o favorable a la entalpía de unión.

También están disponibles en la técnica artículos de software de computadora para evaluar la energía de deformación y la interacción electrostática de los compuestos. Algunos ejemplos incluyen, sin limitación, Gaussian 92 [Gaussian, Inc., Pittsburgh, Pa.]; AMBER [University de California at San Francisco]; QUANTA/CHARMM [Molecular Simulations, Inc., Burlington, Mass.]; e Insight II/Discover [Biosysm Technologies Inc., San Diego, Calif.].

Una vez se ha seleccionado o diseñado óptimamente un agente de unión, como se ha descrito anteriormente, se pueden realizar a continuación sustituciones en algunos de sus átomos o grupos laterales con el fin de mejorar o modificar sus propiedades de unión. Por lo general, las sustituciones iniciales son conservativas, es decir, el grupo de reemplazo tendrá aproximadamente el mismo tamaño, forma, hidrofobicidad y carga que el grupo original. Por supuesto, se ha de entender que se deberían evitar componentes conocidos en la técnica que alteren la conformación. Tales compuestos químicos sustituidos se pueden analizar a continuación para eficacia de ajuste a la proteína DNABII y/o ADN microbiano en la biopelícula mediante los mismos métodos por computadora que se han descrito con detalle anteriormente.

Una realización preferente es un método para analizar sistemáticamente moléculas pequeñas capaces de interactuar con la proteína o el polinucleótido de la divulgación. Para los fines de la presente divulgación, "moléculas pequeñas" son moléculas que tienen pesos moleculares (MW) bajos que son, en una realización, capaces de unirse a una proteína de interés alterando de ese modo la función de la proteína. Preferentemente, el MW de una molécula pequeña es no más de 1000. Los métodos para analizar sistemáticamente moléculas pequeñas capaces de alterar la función de una proteína se conocen en la técnica. Por ejemplo, un ensayo de matriz miniaturizado para detectar interacciones molécula pequeña-proteína en células se discute en You *et al.* (1997) Chem. Biol. 4:961-968.

Para poner en práctica el método de análisis sistemático *in vitro*, se proporciona en primer lugar un cultivo celular o tejido adecuado infectado con el microbio que se trata. Las células se cultivan en condiciones (temperatura, crecimiento o medio de cultivo y gas (CO₂)) y durante una cantidad apropiada de tiempo para obtener la proliferación exponencial sin restricciones dependientes de la densidad. También es deseable mantener un cultivo celular distinto adicional que no esté infectado como control. Como resulta evidente para el experto en la materia, las células adecuadas se pueden cultivar en placas de microvaloración y se pueden someter a ensayo varios agentes al mismo tiempo anotando cambios en el genotipo, cambios en el fenotipo o una reducción en el título microbiano.

Cuando el agente es una composición distinta de un ADN o ARN, tal como una molécula pequeña como se ha descrito anteriormente, el agente se puede añadir directamente al cultivo celular o se puede añadir al medio de cultivo para su adición. Como resulta evidente para el experto en la materia, se debe añadir una cantidad "eficaz" que se puede determinar empíricamente.

Cuando el agente es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, el agente se puede poner en contacto o incubar con el antígeno diana y anticuerpo policlonal como se describe en el presente documento en condiciones para llevar a cabo un ELISA competitivo. Tales métodos se conocen por los expertos en la materia. Los ensayos también se pueden llevar a cabo en un sujeto. Cuando el sujeto es un animal tal como una rata, chinchilla, ratón o similar, el método proporciona un sistema de modelo animal conveniente que se puede usar antes de someter a ensayo clínico un agente en un paciente humano. En este sistema, un agente candidato es un fármaco potencial si los síntomas de la enfermedad o la infección microbiana que reducen o eliminan, cada uno en comparación con un animal sin tratar que tiene la misma infección. También puede ser útil tener un grupo de control negativo distinto de células o animales que estén sanos y no se hayan tratado, lo que proporciona una base para comparación.

Los agentes y las composiciones se pueden usar en la fabricación de medicamentos y para el tratamiento de seres humanos y otros animales por administración de acuerdo con procedimientos convencionales, tales como un ingrediente activo en composiciones farmacéuticas.

Terapia de combinación

Las composiciones y los métodos relacionados de la presente divulgación se pueden usar en combinación con la administración de otras terapias. Estas incluyen, pero no se limitan a, la administración de enzimas de ADNasa, antibióticos, antimicrobianos, u otros anticuerpos.

En algunas realizaciones, los métodos y las composiciones incluyen una enzima desoxirribonucleasa (ADNasa) que actúa de forma sinérgica con el anticuerpo anti-DNABII. Una ADNasa es una enzima que cataliza la escisión de uniones fosfodiéster en la cadena principal de ADN. Tres ejemplos no limitantes de enzimas de ADNasa que se conocen por fijar como diana no solo estructuras cruciformes, sino también una diversidad de estructuras secundarias del ADN incluyen ADNasa I, T4 Endo VII y T7 Endo I. En ciertas realizaciones, la cantidad eficaz de anticuerpo anti-DNABII necesaria para desestabilizar la biopelícula se reduce cuando se combina con una ADNasa. Cuando se administra *in vitro*, la ADNasa se puede añadir directamente al ensayo o en un tampón adecuado conocido por estabilizar la enzima. La dosis unitaria eficaz de ADNasa y las condiciones de ensayo pueden variar, y se pueden optimizar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica.

En otras realizaciones, los métodos y las composiciones se pueden combinar con antibióticos y/o antimicrobianos. Los antimicrobianos son sustancias que eliminan o inhiben el crecimiento de microorganismos tales como bacterias, hongos, o protozoos. Aunque las biopelículas son por lo general resistentes a las acciones de los antibióticos, se pueden usar composiciones y métodos descritos en el presente documento para sensibilizar la infección que implica una biopelícula en métodos terapéuticos tradicionales para tratar infecciones. En otras realizaciones, el uso de antibióticos o antimicrobianos en combinación con métodos y composiciones descritos en el presente documento permiten la reducción de la cantidad eficaz del antimicrobiano y/o el agente reductor de la biopelícula. Algunos ejemplos no limitantes de antimicrobianos y antibióticos útiles en combinación con métodos de la presente divulgación incluyen amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, cefdinir, azitromicina, y sulfametoxazol-trimetoprim. La dosis terapéuticamente eficaz del antimicrobiano y/o antibiótico en combinación con el agente reductor de la biopelícula se puede determinar con facilidad mediante métodos tradicionales. En algunas realizaciones, la dosis del agente antimicrobiano en combinación con el agente reductor de la biopelícula es la dosis eficaz media que se ha mostrado que es eficaz 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 eficaz media. El antibiótico o antimicrobiano se pueden añadir antes de, simultáneamente con, o después de la adición de un anticuerpo anti-DNABII.

En otras realizaciones, los métodos y las composiciones se pueden combinar con anticuerpos que tratan la infección bacteriana. Un ejemplo de un anticuerpo útil en combinación con los métodos y las composiciones que se describen en el presente documento es un anticuerpo dirigido frente a una proteína de membrana exterior no relacionada (es decir, OMP P5). El tratamiento con este anticuerpo solo no apelmaza una biopelícula *in vitro*. La terapia combinada con este anticuerpo y un agente reductor de la biopelícula da como resultado un efecto mayor que el que se podría conseguir mediante el uso de cualquiera de los dos reactivos solos en la misma concentración. Otros anticuerpos que puede producir un efecto sinérgico cuando se combinan con un agente reductor de la biopelícula o métodos para reducir una biopelícula incluyen preparaciones de anti-rsPilA, anti-OMP26, anti-OMP P2, y anti-OMP completo.

Las composiciones y los métodos que se describen en el presente documento se pueden usar para sensibilizar la infección bacteriana que implica una biopelícula en modalidades terapéuticas comunes eficaces en el tratamiento de infecciones bacterianas sin una biopelícula pero que de otro modo son ineficaces en el tratamiento de infecciones bacterianas que implican una biopelícula. En otras realizaciones, las composiciones y los métodos que se describen en el presente documento se pueden usar en combinación con modalidades terapéuticas que son eficaces en el tratamiento de infecciones bacterianas que implican una biopelícula, pero la combinación de tal terapia adicional y el agente o método reductor de la biopelícula produce un efecto sinérgico de un modo tal que se puede reducir la dosis eficaz del agente reductor de la biopelícula o el agente terapéutico adicional. En otros casos, la combinación de tal terapia adicional y el agente o método reductor de la biopelícula produce un efecto sinérgico de un modo tal que se

potencia el tratamiento. Una potenciación del tratamiento se puede evidenciar mediante una menor cantidad de tiempo requerida para tratar la infección. El tratamiento terapéutico adicional se puede añadir antes de, concurrente con, o posterior a los métodos o composiciones que se usan para reducir la biopelícula, y puede estar contenida en la misma formulación o en forma de una formulación distinta.

Kits

También se reivindican kits que contienen los agentes e instrucciones necesarias para llevar a cabo los métodos *in vitro* e *in vivo* que se describen en el presente documento. Por consiguiente, la divulgación proporciona kits para llevar a cabo estos métodos que pueden incluir un interferente de la presente divulgación así como instrucciones para llevar a cabo los métodos de la presente divulgación tal como la recogida de tejido y/o la realización del análisis sistemático, y/o el análisis de los resultados, y/o la administración de una cantidad eficaz de un agente interferente como se define en el presente documento. Estos se pueden usar solos o en combinación con otros agentes antimicrobianos adecuados.

Por ejemplo, un kit puede comprender, o alternativamente consistir básicamente en, o aún más consistir en uno cualquiera o más agentes del grupo de un polipéptido de factor de integración del hospedador (IHF) aislado o recombinante o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos; un polipéptido de proteína aislado o recombinante identificado en la Tabla 8, la Tabla 9, la Tabla 10, un péptido de unión a ADN identificado en la Figura 6, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos; un polipéptido aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 1 a 33, o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos; un polipéptido C-terminal aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 5 a 11, 28, 29 o los identificados en la Tabla 8, la Tabla 10 o un fragmento o un equivalente de cada uno de los mismos; un polipéptido que compite con un factor de integración del hospedador en la unión a un ADN microbiano; un polinucleótido de cruce de cuatro vías que recuerda una unión de Holliday, un polinucleótido de cruce de 3 vías que recuerda una horquilla de replicación, un polinucleótido que tiene flexibilidad inherente o un polinucleótido doblado; un polinucleótido aislado o recombinante que codifica uno cualquiera de los polipéptidos indicados anteriormente; un anticuerpo que reconoce o se une específicamente a uno cualquiera de los polipéptidos indicados 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, e instrucciones para su uso. El kit puede comprender además uno o más de un adyuvante, un péptido antigénico o un antimicrobiano. Algunos ejemplos de vehículos incluyen un vehículo líquido, un vehículo farmacéuticamente aceptable, un vehículo de fase sólida, un vehículo farmacéuticamente aceptable, un polímero farmacéuticamente aceptable, un liposoma, una micela, un implante, una endoprótesis vascular, una pasta, un gel, un implante dental, o un implante médico.

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren, y no limiten, las invenciones desveladas en el presente documento.

Experimental

Experimento N.º 1

Los anticuerpos IHF, proteínas y polipéptidos fueron un presente generoso de Nash. Los métodos para producirlos son bien conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, como se describe en Granston y Nash, (1993) J. Mol. Biol., 234: 45-59; Nash *et al.*, (1987) Journal of Bacteriology, 169 (9): 4124-4127; y Rice *et al.*, (1996) Cell, 87: 1295-1306. En resumen, para producir IHF- α en exceso, el gen *himA* se insertó cadena abajo del promotor P_L en el plásmido bacteriano pAD284. Los transformantes de la cepa K5607, un lisógeno lambda de la cepa C600himA42 que había recibido el plásmido deseado, se identificaron mediante identificación sistemática de transformantes resistentes a ampicilina para la capacidad para cultivar el bacteriófago Mu (13). El ADN se preparó a partir de transformantes *himA*⁺ de acuerdo con técnicas de aislamiento de ADN convencionales, y la orientación del gen *himA* se determinó mediante la escisión de la enzima de restricción. El plásmido pP_LhimA-1, que tiene el gen *himA* en la orientación adecuada para expresión por el promotor P_L, se transformó en la cepa N5271, que contiene un profago lambda críptico que expresa el represor termoinducible cl857, para producir la cepa K5770.

Para producir IHF- β en exceso, se usó el plásmido pKT23-hip323, que contiene una fusión de la secuencia de codificación de IHF con el promotor bacteriófago lambda P_L. Se introdujo pKT23-hip323 en N5271 para dar la cepa E443. Para facilitar la selección de pKT23-hip323 en presencia de otro plásmido, se cambió su marcador seleccionable de resistencia a ampicilina (*bla*⁺) a resistencia a cloranfenicol (*cat*⁺). Se aisló un fragmento que contenía *cat* del plásmido pBR325 como lo describen Flamm y Weisberg y se insertó en el sitio Scal único en *bla*. El ADN ligado se introdujo en la cepa E403, que porta una mutación *hip* y que sintetiza el represor X sensible a la temperatura, y los transformantes resistentes a cloranfenicol se seleccionaron a baja temperatura. Uno de esos transformantes (E735) era sensible a *hip*⁺ y a ampicilina; por lo tanto parece que porta un derivado de *bla cat*⁺ de pKT23-hip323 (pE735).

Para generar una cepa que produce ambas subunidades de IHF en exceso, E735 se transformó con el plásmido pP_LhimA-1, seleccionando un transformante (E738) que se había vuelto resistente a la ampicilina y había retenido la resistencia al cloranfenicol. La generación de una segunda cepa que produce ambas subunidades de IHF en exceso dependía de la construcción del plásmido pP_Lhip himA-5 que preparó ligando un sitio romo (sitio de la enzima de

restricción *Sst*II) que contenía los genes *pheT* y *himA* en el plásmido pKT23-hip323. Esto se describe con más detalle en (Nash *et al.*, (1987) *J. of Bacteriology*, 169 (9): 4124-4127. Los transformantes *himA*⁺ de la cepa K5607 se identificaron mediante detección de *HimA*⁺, y el ADN plasmídico se analizó por digestión de restricción. En todos los casos en los que la estructura del plásmido era evidente, dos copias de *himA* se habían ligado como una repetición directa en tándem en el vector. No se sabe si la selección exige la presencia de dos copias del gen *himA* en este plásmido, pero se debería recordar que una sola copia del gen *himA* en el plásmido pP_L*himA*-1 es suficiente para complementar un mutante de *himA*. El plásmido pP_L*hiphimA*-5 se usó para transformar la cepa N5271 para producir la cepa K5746.

Las células se cultivaron en un baño de agua con agitación a 31 °C en medio TBY (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, y 5 g de cloruro sódico por litro). A la mitad de la fase logarítmica (densidad óptica a 650 nm, aproximadamente 0,6), las células se cambiaron a un baño de agua a 42 °C y se continuó agitando. Por lo general, se centrifugaron 300 ml de cultivo y se suspendieron en 0,6 a 0,9 ml de TEG (clorhidrato de Tris 20 mM (pH 7,4), EDTA sódico 1 mM, glicerol al 10 %) que contenía NaCl 20 mM. Las células se interrumpieron con seis ráfagas de sonicación de 20 s, con 40 s entre cada ráfaga. Una parte del extracto sónico se centrifugó en un rotor Sorvall SS34 durante 20 minutos a 15.000 rpm.

Las muestras del extracto sónico se analizaron mediante electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico (SDS) de acuerdo con técnicas convencionales de biología molecular.

La purificación de IHF se llevó a cabo de acuerdo con lo siguiente: un lote de células de 3,6 litros se indujo durante 3 h. Todas las etapas posteriores se llevaron a cabo de 0 a 4 °C. El sedimento celular de 3,3 litros se suspendió en 10 ml de TEG que contenía NaCl 20 mM para dar un volumen total de 29 ml; esta suspensión se interrumpió en dos lotes, cada uno recibiendo seis ráfagas de sonicación de 3 minutos separadas por intervalos de 90 s. El extracto sónico se centrifugó durante 20 minutos a 15.000 rpm, proporcionando 16,9 ml de extracto clarificado. Una solución (1,1 ml) al 10 % (vol/vol) de polimina P (BDH Chemicals Ltd.) se añadió lentamente al extracto clarificado; después de agitarse durante 20 minutos, la mezcla se centrifugó durante 30 minutos a 10.000 rpm. El sedimento resultante se suspendió en 10 ml de TEG que contenía NaCl 500 mM; después de agitarse durante 15 minutos, la mezcla se centrifugó durante 20 minutos a 12.000 rpm. El sobrenadante (10,3 ml) se ajustó al 50 % de saturación mediante la adición de 3,2 g de sulfato de amonio, se agitó durante 20 minutos, y se centrifugó durante 15 minutos a 15.000 rpm. El sobrenadante resultante se ajustó al 70 % de saturación mediante la adición de 1,64 g de sulfato de amonio, se agitó durante 20 minutos, y se centrifugó durante 15 minutos a 15.000 rpm. Los sedimentos resultantes se suspendieron en 1 ml de TG (clorhidrato de Tris 50 mM (pH 7,4) que contenía glicerol al 10 %) y se dializaron frente a dos cambios de TG. El material dializado (2,0 ml) se cargó en una columna de 1 ml (0,5 por 5,8 cm) de fosfocelulosa (P11; Whatman, Inc.) que se había equilibrado con TG. La columna se lavó con 3 ml de TG y se desarrolló con 20 ml de un gradiente lineal (0 a 1,2 M) de KCl en TG. Las fracciones de 0,5 ml se recogieron, se almacenaron a -20 °C, y se analizaron para actividad de IHF.

El anti-IHF policlonal se preparó como sigue a continuación. A los conejos se les inyectaron 250 µg de IHF purificado con adyuvante completo de Freund. Las inmunizaciones de refuerzo de 250 µ de IHF con adyuvante incompleto de Freund se administraron 1, 7, y 12 semanas más tarde. Tal como se determina mediante inmunotransferencia de IHF, los sueros recogidos 13 semanas después de la inyección inicial tenían un título elevado de material reactivo a IHF. Los animales se mantuvieron durante varios años y, cuando fue necesario, se les administró una mayor inmunización de refuerzo para mantener un alto título de anti-IHF en sus sueros. El anticuerpo no se purificó más. Los sueros sin procesar se almacenaron a -70 °C.

Los anticuerpos específicos para cada subunidad se generaron usando polipéptidos sintéticos que corresponden a la mayor parte de los 20 restos de aminoácido C-terminales de cada subunidad (SEQ ID NOS: 34 y 35), para inmunizar conejos de acuerdo con Ditto *et al.*, (1994) *J. of Bacteriology*, 176 (12): 3738-3748.

Experimento 2

Este experimento describe un modelo *in vitro* para la reversión de una biopelícula establecida en un portaobjetos de cámara de 8 pocillos. Los materiales usados en este experimento fueron: Agar Chocolate; sBHI (BHI con 2 mg de hemo/ml y 2 mg de b-NAD/ml); portaobjetos de cámara de 8 pocillos (n.º de catálogo 12-565-18 de Nunc* Lab-Tek* Fisher); solución salina estéril al 0,9 %; Kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight (n.º de catálogo NC9439023 de Fisher) y Formalina.

El día 1, NTHI se usó para aislamiento en agar chocolate. A continuación se incubó durante 20 h a 37 °C y CO₂ al 5 %. Al día siguiente, las bacterias se suspendieron en 5 ml de sBHI equilibra. (37 °C, CO₂ al 5 %) y la densidad óptica se ajustó a DO₄₉₀ = 0,65 en sBHI. Las bacterias se diluyeron a 1:6 en sBHI equilibrado (1 ml de suspensión bacteriana + 5 ml de sBHI). A continuación las bacterias se incubaron durante 3 horas 37 °C en CO₂ al 5 %, estático ((la DO₄₉₀ debería ser aprox. 0,65). A continuación, las bacterias se diluyeron nuevamente a 1:2500 en sBHI equilibrado y se añadieron 200 ml de la suspensión bacteriana a cada pocillo del portaobjetos de la cámara. Para la dilución, se añadieron 10 µl de bacterias a 990 µl de sBHI en un tubo eppendorf y 8 µl de dilución se añadieron a 192 µl de sBHI en cada cámara y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 %, estático.

Al tercer día (después de 16 horas de incubación el medio se aspiró de la cámara aspirando medio de la esquina del pocillo para no alterar la biopelícula. A continuación se añadieron 200 ml de sBHI equilibrado a cada cámara y se incubó a 37 °C, CO₂ al 5 %, estático durante 8 horas. Después de 8 horas, el medio se aspiró y se añadieron 200 ml de sBHI equilibrado a cada cámara no tratada; y se añadieron 200 ml de agente interferente tal como anti-rsPi1A de conejo; se diluyó a 1:50 en sBHI y se añadieron 200 ml de suero de conejo no comprometido (u otro control de suero apropiado) diluido a 1:50 en sBHI. A continuación se incubó a 37 °C y CO₂ al 5 %, estático.

El día 4, después de aproximadamente 16 horas de incubación, se aspiró el sBHI aspirado y la biopelícula se lavó dos veces con 200 ml de solución salina estéril. La solución salina se aspiró y se añadieron 200 ml de tinción Live/Dead. A continuación, se añadieron 3 ml de componente A más 3 ml de componente B en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato 10 mM estéril. A continuación se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, estático, protegido de la luz. La mancha se aspiró y la biopelícula se lavó dos veces con 200 ml de solución salina estéril. La solución salina se aspiró y se añadieron 200 ml de formalina para fijar la biopelícula. A continuación se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, estático, protegido de la luz. La formalina se aspiró y la biopelícula se lavó dos veces con 200 ml de solución salina estéril. La junta se retiró y el cubreobjetos se colocó en el portaobjetos; el cubreobjetos se selló con esmalte de uñas y se secó antes de verlo por microscopía confocal.

Usando este método y anticuerpo anti-IHF, los solicitantes redujeron una biopelícula producida por *Haemophilus influenzae* que prevalece en sinusitis, bronquitis, otitis media y exacerbaciones de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La masa de biopelícula no tratada tenía una medida de 4,24 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ con un grosor medio de 11,68 μm . Después del tratamiento, la masa de la biopelícula se redujo a 0,53 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ con un grosor medio de 1,31 μm . Por lo tanto, esto muestra una reducción de un 88,8 % del grosor medio y una reducción de un 87,5 % de la biomasa.

El antisuero policlonal dirigido frente al IHF de *E. coli* se preparó en conejos de acuerdo con técnicas convencionales usando el Factor de Integración del Hospedador (IHF) purificado. El experimento 1 describe la expresión y la purificación de IHF de *E. coli*.

Usando este método y anticuerpo anti-IHF, los solicitantes redujeron una biopelícula producida por *Streptococcus mutans* que prevalece en el inicio y la progresión de la caries dental. La masa de biopelícula no tratada tenía una medida de 1,17 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ con un grosor medio de 5,43 μm . Después del tratamiento, la masa de la biopelícula se redujo a 0,1 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ con un grosor medio de 0,47 μm . Por lo tanto, esto muestra una reducción de un 91,3 % del grosor medio y una reducción de un 91,6 % de la biomasa. Los ensayos de biopelícula *in vitro* se repitieron 3 veces, en días separados. El porcentaje de reducción de la altura máxima, grosor promedio, y biomasa se representan en la Tabla 1 que sigue a continuación.

Tabla 1

		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
<i>S. mutans</i>	Altura máx. (μm)	56	24	41
	Grosor promedio (μm)	65	65	67
	biomasa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	37	58	66

Usando este método y anticuerpo anti-IHF, los solicitantes redujeron una biopelícula producida por *Staphylococcus aureus* que prevalece en infecciones cutáneas localizadas y difusas, rinosinusitis crónica e infecciones nosocomiales. La masa de biopelícula no tratada tenía una medida de 0,3 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ con un grosor medio de 2,2 μm y una altura de la biopelícula de 17,5 μm . Después del tratamiento, la masa de la biopelícula se redujo a 0,3 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ con un grosor medio de 1,1 μm y una altura de la biopelícula de 8 μm . Por lo tanto, esto muestra una reducción de un 48,8 % del grosor medio y una reducción de un 2,7 % de la biomasa (Figura 7).

Usando este método y anticuerpo anti-IHF, los solicitantes redujeron una biopelícula producida por *Moraxella catarrhalis* que prevalece en exacerbación de EPOC y otitis media.

La masa de biopelícula no tratada tenía una medida de 0,72 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ con un grosor medio de 1,48 μm . Después del tratamiento, la masa de la biopelícula se redujo a 0,13 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ con un grosor medio de 0,65 μm . Por lo tanto, esto muestra una reducción de un 55,8 % del grosor medio y una reducción de un 82,1 % de la biomasa. Los ensayos de biopelícula *in vitro* se repitieron 3 veces, en días separados. El porcentaje de reducción de la altura máxima, grosor promedio, y biomasa se representan en la Tabla 2 que sigue a continuación.

Tabla 2

		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
<i>M. catarrhalis</i>	Altura máx. (µm)	61	33	36
	Grosor promedio (µm)	92	34	84
	biomasa (µm ³ /µm ²)	92	35	92

Usando este método y anticuerpo anti-IHF, los solicitantes redujeron una biopelícula producida por *Streptococcus pneumoniae* que prevalece en sinusitis, neumonía y otitis media. La masa de biopelícula no tratada tenía una medida de 0,64 µm³/µm² con un grosor medio de 3,99 µm. Después del tratamiento, la masa de la biopelícula se redujo a 0,14 µm³/µm² con un grosor medio de 0,82 µm. Por lo tanto, esto muestra una reducción de un 79,5 % del grosor medio y una reducción de un 78,6 % de la biomasa. Los ensayos de biopelícula *in vitro* se repitieron 3 veces, en días separados. El porcentaje de reducción de la altura máxima, grosor promedio, y biomasa se representan en la Tabla 3 que sigue a continuación.

Tabla 3

		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
<i>S. pneumoniae</i>	Altura máx. (µm)	49	51	44
	Grosor promedio (µm)	25	64	79
	biomasa (µm ³ /µm ²)	51	61	79

Usando este método y anticuerpo anti-IHF, los solicitantes redujeron una biopelícula producida por *Pseudomonas aeruginosa* que prevalece en fibrosis quística, neumonía, piel e infecciones de tejido blando y en dispositivos médicos. La masa de biopelícula no tratada tenía una medida de 7,0 µm³/µm² con un grosor medio de 25,70 µm y una altura de la biopelícula de 40 µm. Después del tratamiento, la masa de la biopelícula se redujo a 3,4 µm³/µm² con un grosor medio de 10,3 µm y una altura de la biopelícula de 27,5 µm. Por lo tanto, esto muestra una reducción de un 60,1 % del grosor medio y una reducción de una reducción de un 50,8 % de la biomasa (Figura 7).

Usando este método y anticuerpo anti-IHF, los solicitantes redujeron una biopelícula producida por *Neisseria gonorrhoeae* que se encuentra en la gonorrea. La masa de biopelícula no tratada tenía una medida de 9,5 µm³/µm² con un grosor medio de 22,02 µm y una altura de la biopelícula de 40 µm. Después del tratamiento, la masa de la biopelícula se redujo a 0,8 µm³/µm² con un grosor medio de 3,4 µm y una altura de la biopelícula de 27,5 µm. Por lo tanto, esto muestra una reducción de un 84,5 % del grosor medio y una reducción de un 92,1 % de la biomasa (Figura 7).

Usando este método y anticuerpo anti-IHF, los solicitantes redujeron una biopelícula producida por *E. coli* *Uropatogena* que prevalece en infecciones del tracto urinario. La masa de biopelícula no tratada tenía una medida de 1,75 µm³/µm² con un grosor medio de 31,73 µm. Después del tratamiento, la masa de la biopelícula se redujo a 0,75 µm³/µm² con un grosor medio de 1,62 µm. Por lo tanto, esto muestra una reducción de un 94,9 % del grosor medio y una reducción de un 56,9 % de la biomasa. Los ensayos de biopelícula *in vitro* se repitieron 3 veces, en días separados. El porcentaje de reducción de la altura máxima, grosor promedio, y biomasa se representan en la Tabla 4 que sigue a continuación.

Tabla 4

		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
UPEC	Altura máx. (µm)	69	65	76
	Grosor promedio (µm)	97	33	95
	biomasa (µm ³ /µm ²)	98	96	57

Usando este método y anticuerpo anti-IHF, los solicitantes redujeron una biopelícula producida por *Staphylococcus epidermidis* que prevalece en infecciones de la piel. Los ensayos de biopelícula *in vitro* se repitieron 3 veces, en días separados. El porcentaje de reducción de la altura máxima, grosor promedio, y biomasa se representan en la Tabla 5 que sigue a continuación.

Tabla 5

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
<i>S. epidermidis</i>			
Altura máx. (µm)	42	38	56
Grosor promedio (µm)	62	71	92
biomasa (µm ³ /µm ²)	62	76	88

Experimento N.º 3

5

La infección del oído medio (otitis media, OM) es una enfermedad altamente prevalente en todo el mundo, que afecta a 50 - 330 millones de niños en todo el mundo cada año. La carga socioeconómica de la OM también es grande, con costes calculados entre 5-6 mil millones de dólares solo en Estados Unidos al año. Se sabe que los tres patógenos bacterianos predominantes de la OM forman biopelículas tanto *in vitro* como *in vivo* y recientemente, los médicos han llegado a observar que la cronicidad y recurrencia de la OM se debe, al menos en parte, a la formación de biopelículas bacterianas en el interior de la cavidad del oído medio. En un modelo de OM de chinchilla, a las chinchillas juveniles primero se les produce un "resfriado" viral, y una semana después se las estimula por vía intranasal con un inóculo de bacterias viables. Al igual que en la afección humana en la que "mi hijo tiene un resfriado y una semana después contrae una infección de oído", las chinchillas también desarrollarán una OM bacteriana aproximadamente una semana después de una estimulación, y a la vez que experimentan la infección viral de las vías respiratorias superiores. Una vez que las bacterias acceden al oído medio (ya sea a través de la ascensión de la trompa de Eustaquio o después de la estimulación directa al espacio del oído medio), formarán una biopelícula resistente. Los solicitantes, por lo tanto, contemplan y de hecho ya han usado modelos de chinchilla como se informa en el presente documento para demostrar la eficacia protectora de la inmunización con IHF que da como resultado una resolución rápida de las biopelículas existentes. Este modelo también es útil para enfoques terapéuticos a través de la administración pasiva de anticuerpos anti-DNABII o mediante la administración de una molécula pequeña u otro agente conocido por su unión a IHF u otros miembros de la familia DNABII.

Dado que el modelo de chinchilla se usa para desarrollo y ensayo preclínica de vacunas humanas, es importante establecer paralelos inmunológicos significativos con el hospedador humano, en particular el niño. Los solicitantes han demostrado que las efusiones recuperadas de niños con AOM debido a NTHI, y fluidos del oído medio de chinchillas con OM experimental inducida por NTHI, reconocieron regiones inmunodominantes de OMP P5 de manera jerárquica similar (véase Novotny LA, *et al.*, (2000) Infect Immun. 68 (4): 2119-28; Novotny LA, *et al.*, (2007) 9th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media; St. Pete Beach, FL; Novotny LA, *et al.*, (2002) Vaccine 20 (29-30): 3590-97). Los solicitantes también han demostrado que las chinchillas con OM experimental, los niños con OM natural y los adultos con exacerbaciones de EPOC, todos reconocieron péptidos que representan PilA de manera muy análoga (véase por ejemplo Adams LD, *et al.*, (2007) 107th General Meeting, American Society for Microbiology; 2007; Toronto, ON; Adams LD, *et al.*, (2007) 9th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media; St. Pete Beach, FL.). Por lo tanto, las chinchillas con OM experimental y los niños con enfermedad natural responden de manera inmunológicamente similar a al menos dos adhesinas de proteínas NTHI no relacionadas. Este paralelo se sometió a ensayo recientemente, cuando se usó el modelo de superinfección con AV-NTHI de chinchilla para realizar ensayos de eficacia preclínicos de una nueva vacuna conjugada con polisacárido neumocócico con proteína D 11-valente. Los datos obtenidos en la chinchilla predijeron una eficacia de un 34 % mientras que, cuando se sometió a ensayo en niños, la eficacia obtenida frente a la OM inducida por *H. influenzae* fue de un 35,6 % (véase por ejemplo Novotny LA, *et al.*, (2006) Vaccine 24 (22): 4804-11 y Prymula R, *et al.*, (2006) Lancet. 367 (9512): 740-8), lo que proporciona un fuerte apoyo a la relevancia de este modelo para el desarrollo y ensayo de candidatos a vacunas para OM.

Los solicitantes han mostrado una reducción espectacular de la biopelícula formada previamente que queda dentro del oído medio de las chinchillas después de recibir 2 inmunizaciones TC a la semana con IHF administrado con un adyuvante mucoso/sistémico.

Se adquirieron 48 adultos en el Rauscher's Chinchilla Ranch (LaRue, Ohio) y se aclimataron al vivero durante 7-10 días antes del comienzo del estudio. Antes del ensayo de TB [estimulación transbullar o directa en la cavidad del oído medio], se llevaron a cabo otoscopia de medida inicial y timpanometría, así como un volumen limitado de extracción de sangre previa para recoger el suero.

Las chinchillas se anestesiaron y 300 µl de NTHI (cepa n.º 86-028NP) de suspensión que contenía aproximadamente 1000 cfu se introdujeron en el espacio del oído medio a través de una estimulación transbullar. Se permitió que los animales se recuperaran, a continuación se monitorizar un diariamente para detectar reacciones adversas de acuerdo con protocolos para el uso de animales aceptado por IACUC. La otoscopia y la timpanometría de rutina se llevaron a cabo cada 2-3 días a lo largo del estudio.

Cuatro días después de la estimulación (día +4), las chinchillas se anestesiaron y se llevó a cabo un barrido de CT

para visualizar las biopelículas presentes en el oído medio y obtener imágenes de inmunización previa. La superficie de las aurículas se limpió y se hidrató limpiándola con una gasa estéril humedecida con solución salina estéril libre de pirógenos. Después de ~ 2 minutos (para permitir que las aurículas se secaran), se añadirán 50 µl de cualquiera de dmLT, IHF (IHF de *E. coli* purificado de acuerdo con el Experimento 1) + dmLT, o solución de IHF + rsPilA + dmLT se añadirá a las aurículas y se masajea suavemente. Se sacrificaron tres chinchillas por cohorte y se recogieron tejidos/muestras (los días +4, y +11) para comenzar a determinar el mecanismo de acción.

Once días después de la estimulación (día +11), la inmunización secundaria se produjo como se ha descrito anteriormente, en la que las aurículas se limpiaron/hidrataron y los inmunógenos se administraron por vía tópica. Se sacrificaron tres chinchillas por cohorte y se recogieron tejidos/muestras para comenzar a determinar el mecanismo de acción.

Dieciocho días después de la estimulación (día +18), las chinchillas se anestesiaron y se llevó a cabo un barrido de CT para identificar cualquier biopelícula presente, así como para compararla con los barridos de CT previos a la inmunización. A los animales se les extrajo sangre para recoger el suero y se sacrificaron. Las bullas se diseccionan y los fluidos presentes se recogen de forma aséptica, las bullas a continuación se abren para visualizar la bulla inferior y cualquier biopelícula presente. Las imágenes se recogieron y las bullas se lavaron con 1 ml de solución salina estéril y se volvió a formar una imagen. La mucosa, junto con cualquier biopelícula presente, se recogió de la bulla derecha y se colocaron en un tubo pesado previamente. Estos tejidos se homogeneizaron, se diluyeron en serie, se colocaron en placas para determinar el tejido de peso húmedo de cfu de NTHI/mg. Las bullas izquierdas se llenaron con compuesto OCT y se congelaron rápidamente para el análisis histológico.

Las imágenes de las cavidades del oído medio izquierdo y derecho, con biopelículas residentes, se codificaron y se recogieron dos imágenes por animal en un solo archivo para su clasificación por evaluadores con ocultación. Los revisores con ocultación clasificaron la cantidad relativa de biomasa restante dentro del oído medio de cada animal en una escala de 0 a 4+ usando la escala que se muestra en la Tabla 6 que sigue a continuación. Los títulos de los ELISA, matrices de citoquina, y Biacore se desarrollaron en el suero y en las efusiones del oído medio recogidas. Los oídos medios embebidos en OCT se seccionaron y se tiñeron para la morfología básica y la arquitectura (H y E) o para la presencia de IHF usando inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia.

Tabla 6

Puntuación	Criterios
0	Sin evidencia de biomasa.
1+	La biomasa rellena ≤ 25 % de espacio del oído medio. La unión del tabique óseo a la bulla inferior es visible.
2+	La biomasa rellena > 25 % a ≤ 50 % de espacio del oído medio. Imposible visualizar donde se encuentra el tabique óseo con la bulla inferior.
3+	La biomasa rellena > 50 % a ≤ 75 % de espacio del oído medio. La biomasa cubre > 50 % de la longitud del tabique óseo.
4+	La biomasa rellena > 75 % a ≤ 100 % de espacio del oído medio. El tabique óseo no es visible; oscurecido por la biomasa.

La formación de imágenes de inmunofluorescencia de secciones congeladas de biopelículas formadas *in vivo* se llevó a cabo de acuerdo con lo siguiente. Después de la disección, el oído medio de cada chinchilla se llenó con compuesto de inclusión de OCT (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) y se congeló rápidamente con nitrógeno líquido. Se extrajo el hueso que forma la bulla inferior para dejar intacta la mucosa del oído medio y la biopelícula existente. El bloque resultante se diseccionó para revelar una sección transversal de la biopelícula y se volvió a embeber en OCT. Se cortaron secciones en serie de diez micrómetros usando un criotomo giratorio Microm, adherido a portaobjetos de vidrio (Mercedes Medical, Sarasota, FL) y se almacenaron a -80 °C. A continuación las secciones se tiñeron para determinar la incorporación relativa de IHF dentro de las biopelículas que se habían formado *in vivo*. En resumen, los portaobjetos se secaron al aire, se fijaron en acetona fría, a continuación se equilibraron en tampón (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M y Tween 20 al 0,05 %, pH 7,4).

Las secciones se bloquearon con el potenciador de señales image-iT FX (Molecular Probes, Eugene, OR) y con Background Sniper (BioCare Medical, Concord, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secciones se incubaron a continuación con una dilución a 1:200 de anti-IHF conejo policlonal durante la noche a 4 °C, en una cámara humidificada. Además los portaobjetos se enjuagaron y se incubaron con IgG de cabra anti-conejo conjugada con AlexaFluor 594 (Invitrogen) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Como contratiempo, las secciones se incubaron con DAPI y el portaobjetos se cubrió con un reactivo antivaho Pro Long Gold (Molecular Probes, Eugene, OR). El suero de conejo no comprometido sirvió como control negativo. Las secciones se visualizaron con un sistema confocal LSM 510 Meta de Zeiss conectado a un microscopio invertido Axiovert 200 de

Zeiss (Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY).

Las diferencias significativas en la media de CFU/mg de tejido y la media de CFU NTHI/ml de sobrenadante se determinaron mediante el ensayo t emparejado. Un valor de $p \leq 0,05$ se consideró significativo. La importancia de la biomasa relativa entre las cohortes se evaluó mediante el ensayo t sin emparejamiento. Un valor de $p \leq 0,05$ se consideró significativo.

Como se muestra en la Figura 9, Panel A, la puntuación media para la biomasa restante en los oídos medios de chinchillas inmunizadas con adyuvante solo fue 2,8, lo que indicaba una enfermedad restante significativa y una falta de resolución de la biomasa formada previamente en la mayoría de los animales en el día 18 después de la estimulación bacteriana del oído medio. Por el contrario, la puntuación media para un animal inmunizado con IHF de *E. coli* + adyuvante fue de 1,5. Las imágenes representativas de una biomasa residual que recibió una puntuación media de +2,8 y una que recibió una puntuación media de +1,5 se muestran en la Fig. 9, Panel B. Además, como se muestra en la Figura 10, la resolución de la enfermedad se midió adicionalmente tanto por la evidencia histológica de arquitectura de biomasa alterada en el oído medio (véase el Panel A), así como una reducción estadísticamente significativa de la carga bacteriana presente en la biomasa restante, medida por la homogeneización de la biomasa y el cultivo en agar chocolate (véase el Panel B). Además, todos los animales inmunizados con IHF de *E. coli* aislado presentaron una fuerte respuesta inmunológica local y sistémica y ningún animal presentó secuelas secundarias evidentes como resultado de la inmunización como se observó después de la necropsia (los datos no se muestran).

La eficacia notable observada cuando el anti-IHF se usó *in vitro* para eliminar las biopelículas y también de IHF de *E. coli* purificado, cuando se usó como un inmunógeno *in vivo* para inducir la formación de anticuerpos policlonales que podrían resolver una enfermedad por la biopelícula en curso, creó un enigma en cuanto a por qué los hospedadores mamíferos no remontan naturalmente una respuesta inmunológica eficaz a las proteínas DNABII que están asociadas con el ADNc dentro de las biopelículas bacterianas de patologías recurrentes y/o crónicas. En la revisión de la estructura resuelta de IHF cuando está unido al ADN (Rice *et al.*, (1996) *Cell* **87** (7): 1295-1306), es evidente que una parte significativa de la estructura de la proteína está ocluida por el ADN unido, lo que sugiere la posibilidad de oclusión de epítomos protectores o dominios de IHF y/o HU cuando se unen a ADNc dentro de una biopelícula bacteriana. Se planteó la hipótesis de que el uso de IHF nativo, al que no se unía el ADN, como inmunógeno podría proporcionar un mecanismo para superar dicha oclusión y, por lo tanto, fomentar la producción de anticuerpos protectores.

Para determinar si el ADNc realmente podría prevenir el desarrollo de anticuerpos protectores dirigidos frente a un miembro de la familia DNABII después de la inmunización, mientras que el uso de proteína nativa fuera eficaz, se llevó a cabo un segundo estudio de cohorte más grande en el que esencialmente se repitió el estudio en chinchilla como se ha detallado anteriormente.

Para el segundo estudio de inmunización animal, veinte chinchillas adultas (masa corporal entre 500 - 700 g), que no mostraron evidencia de enfermedad del oído medio por timpanometría y vídeo otoscopia, se inscribieron y se dividieron en cuatro cohortes de 5 animales cada una. Todos los animales se estimularon de nuevo por vía transbular con aproximadamente 1000 CFU de cepa NTHI 86-028NP por bulla. Cuatro días más tarde, después de que se formara una biopelícula en las cavidades del oído medio de estos animales, se inmunizaron por vía transcutánea (TCI) como se al escrito anteriormente. Las formulaciones consistieron en cualquiera de: 100 µg de IHF mezclado con 10 µg de dmLT, 10 µg de IHF que se habían unido previamente a ADN + dmLT, ADN + dmLT, o 10 µg de dmLT solo.

Para determinar si el TCI con IHF unido previamente al ADN daba como resultado una respuesta inmunológica similar a la inducida cuando el mismo complejo de nucleoproteína se administraba por vía subcutánea (SQ), y en comparación con el inducido por IHF solo, se inmunizaron dos chinchillas adultas para generar antisueros. Cada animal recibió una dosis de cebado seguida de dos aumentos idénticos administrados a intervalos de 30 días. Los inmunógenos se mezclaron con el adyuvante monofosforil lípido A (MPL) (10 µg/dosis) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) debido a sus fuertes propiedades adyuvantes demostradas en el hospedador de la chinchilla (véase, por ejemplo, Bakaletz *et al.*, (1999) *Infect Immun.* **67** (6): 2746-2762 y Kennedy *et al.*, (2000) *Infect. Immun.* **68** (5): 2756-2765. Una chinchilla se inmunizó con 10 µg de IHF + MPL y la otra recibió 10 µg de IHF unido a ADN + MPL. Todas las dosis se administraron SQ en un volumen total de 200 µl. Quince días después de recibir la estimulación final, a los animales se les extrajo sangre para obtener suero y los sueros se analizaron mediante transferencia de Western y ELISA para determinar tanto el título recíproco como la especificidad de reactividad del anticuerpo frente a IHF.

Los oídos medios se puntuaron posteriormente de 0 a 4+ para la gravedad de la enfermedad al finalizar el estudio. Para asegurar mejor que el IHF y el ADN permanecían en el complejo para la inmunización, se usaron oligonucleótidos sintéticos idénticos a los usados en el estudio de cocristalización publicado (véase por ejemplo Rice *et al.*, (1996) *Cell* **87** (7): 1295-1306) de un sitio de unión a IHF de alta afinidad del sitio attP de recombinación lambda del bacteriófago en una proporción molar de 2:1 [ADN (10 µM) a IHF (5 µM)]. Esta cantidad fue de al menos 3 órdenes de magnitud con respecto a la K_d de IHF unido a esta diana de ADN. Como se muestra en la Figura 11, el IHF se unió al ADNc como lo demuestra su movilidad reducida en un ensayo de cambio de movilidad electroforética.

Como se muestra en la Figura 12, los animales inmunizados con IHF de *E. coli* aislado mostraron una reducción espectacular en el estado de la enfermedad con una puntuación de biomasa residual media del oído medio de 0,9 en comparación con los controles que habían sido inmunizados con adyuvante solo (puntuación de biomasa media = 2,2) o con aquellos que habían sido inmunizados con ADN que se había mezclado con adyuvante (puntuación de biomasa media = 2,8). De manera interesante, aquellos animales que habían sido inmunizados con el complejo IHF-ADN también presentaron oídos medios con biomasa bacteriana restante significativa, produciendo una puntuación de biomasa media de 2,5 que no fue estadísticamente diferente de las cohortes que recibieron el adyuvante solo o el ADN que había sido mezclado con adyuvante. Este resultado sugirió fuertemente que si hubiera suficientes fragmentos de ADN presentes, como se podría hacer la hipótesis si fuera el caso durante una enfermedad natural, esta situación podría dar como resultado la oclusión de epítomos críticos de IHF necesarios para la generación de anticuerpos neutralizantes.

Para asegurarse de que el resultado de la oclusión del ADN observado no era específico para el uso de una ruta de inmunización transcutánea, se repitieron estas inmunizaciones usando una ruta de inmunización subcutánea (SQ) para asegurar la administración de los antígenos a las células presentadoras de antígeno dentro del hospedador de la chinchilla. Como se muestra en la Figura 13, mientras que la inmunización SQ con IHF de *E. coli* aislado produjo la generación de una respuesta inmunológica fuerte a IHF aislado, la inmunización con IHF de *E. coli* que se había unido previamente a un exceso de ADN no pudo inducir anticuerpos detectables que reconocieran IHF cuando se sometía a ensayo mediante transferencia Western. Cuando se analizó mediante ELISA, el título recíproco con respecto al IHF aislado fue de 1000 para el animal inmunizado con IHF que se había unido previamente a oligonucleótidos, mientras que para el animal inmunizado con IHF nativo fue de 8000 (los títulos recíprocos preinmunes de ambos animales frente a IHF fueron 100). De forma colectiva, estos resultados son coherentes con la hipótesis de los investigadores de que la unión de IHF a ADN, como se podría producir durante una patología natural, tiene el potencial de bloquear epítomos o dominios de IHF necesarios para generar una respuesta inmunológica adquirida protectora. Además, parecía que la inmunización con IHF nativo (al que no se une el ADN) permitía la dirección eficaz de la respuesta inmunológica hacia la generación de anticuerpos protectores o neutralizantes, como se demostró en los dos estudios preclínicos de chinchilla que se describen aquí.

Experimento N.º 4

Una serie de bacterias orales (por ejemplo, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*) se han implicado en la patogénesis de enfermedades inflamatorias tales como periodontitis y periimplantitis, que destruyen el hueso alveolar y la encía. Las investigaciones sobre la patogénesis de estas bacterias se ven obstaculizadas por la falta de modelos animales eficaces. Uno de los desafíos de la investigación de la patogenidad de bacterias específicas es la dificultad de establecer una biopelícula cuando se introducen bacterias exógenas en la cavidad oral de los animales. Aunque se han desarrollado modelos animales de periodontitis, las bacterias cultivables rara vez se recuperan de la cavidad oral de los animales inoculados. El desarrollo de un modelo animal eficaz que pueda evaluar la patogenidad de bacterias específicas ayudará enormemente a dilucidar sus mecanismos patogénicos.

La superficie de los implantes dentales de titanio mecanizados (1,2 x 4,5 mm) se modificó mediante granallado con grabado con AlO_3 (100 μm) y HCl (pH 7,8 durante 20 min a 80 °C). Los implantes mecanizados y nanotexturizados se incubaron en medio TSB inoculado con la cepa clínica D7S de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) de 1 a 3 días a 37 °C. La biopelícula bacteriana en los implantes se analizó por SEM, así como por microscopía de barrido láser confocal después de tinción con LIVE/DEAD® BacLight™. Los implantes con y sin biopelícula de Aa establecida se colocaron por vía transmucosa en el hueso alveolar de las ratas hembras entre la región premolar e incisiva de los maxilares. Para detectar la presencia de biopelícula de Aa en los implantes colocados *in vivo*, se recogieron muestras bacterianas de saliva y las superficies orales de los implantes después de 2 días. Aa se detectó por cultivo, así como por análisis de PCR. El análisis Micro-CT e histológico de tejido periimplantario de hueso y mucosa se llevó a cabo seis semanas después de la implantación.

Después de un día de cultivo, se encontraron aglomerados de células Aa en forma de cocoide dispersas por todo el implante. Después de dos días, el número y tamaño de los aglomerados disminuyó y se observaron más células de diferentes longitudes que variaban entre bacterias con morfología cocoide. Después de tres días de incubación, los aglomerados casi habían desaparecido, mientras que grandes áreas de la superficie del implante estaban cubiertas de bacterias con morfología en forma de bastón, formando una biopelícula densamente compactada. La tinción con LIVE/DEAD® de la biopelícula de Aa de tres días de ese tipo en los implantes mostró una señal verde para un 75-80 % de todas las bacterias de biopelícula, lo que indica células vivas con integridad de membrana sin comprometer. La detección microbiológica y de PCR de la biopelícula de Aa en implantes colocados *in vivo* fue positiva para las muestras de las superficies del implante y negativa para las muestras de saliva, así como los implantes de control. El examen clínico demostró una inflamación significativa de la mucosa periimplantaria alrededor de los implantes con biopelícula de Aa, en comparación con los implantes de control no tratados. El análisis Micro-CT e histológico de hueso periimplantario y tejidos mucosos están pendientes. Las superficies de los implantes nanotexturizados favorecen el establecimiento de la biopelícula de Aa y aumentan el riesgo de periimplantitis.

Experimento N.º 5

Este experimento proporciona un modelo de ratón para ensayos preclínicos de agentes interferentes para tratar la enfermedad de Lyme. Véase Dresser *et al.* Pathogens 5(12)el000680, Epub de 4 de diciembre de 2009. La enfermedad de Lyme es la enfermedad transmitida por garrapatas más común en Estados Unidos. Los casos informados no han hecho más que duplicarse entre 1992 y 2006, con aproximadamente 29.000 nuevos casos confirmados en 2008. Se calcula que el número real de casos de enfermedad de Lyme puede superar el informado en un factor de 6 - 12 en áreas endémicas. Por definición, estas áreas endémicas se están expandiendo a medida que las poblaciones continúan moviéndose de las ciudades a las áreas suburbanas y rurales y el venado cola blanca (que exportador de la especie de garrapatas *Ixodes*) deambula cada vez más por estas áreas. La enfermedad de Lyme está causada por el microorganismo *Borrelia burgdorferi*, una espiroqueta. *B. burgdorferi* se transmite a través de la picadura de la garrapata *Ixodes* y a continuación se disemina, a través del torrente sanguíneo, a otros tejidos y órganos.

En este modelo animal, a los ratones C3H/HeN se les inyectan espiroquetas a través de inyección dorsal subcutánea e intraperitoneal, o por inyección intravenosa. Las muestras de sangre y biopsia se recuperan aproximadamente 7 días después de la infección para la evaluación de la carga microbiana y la evaluación de la patología en los tejidos y órganos. Se contempla que los métodos y composiciones de la presente divulgación desarrollan tanto estrategias terapéuticas como preventivas para reducción y/o eliminación de las biopelículas de *B. burgdorferi* resultantes que se forman después de la estimulación y se cree que contribuyen tanto a la patogénesis como a la naturaleza crónica de la enfermedad.

Experimento N.º 6

La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva debido a mutaciones en un gen que codifica el canal aniónico regulador de la conductancia transmembrana de CF (llamado CFTR). En este modelo, los cerdos que han sido criados específicamente para portar un defecto en los genes llamados "CFTR" y llamados cerdos CF desarrollan espontáneamente características distintivas de la enfermedad pulmonar por CF que incluye la infección de las vías respiratorias inferiores por múltiples especies bacterianas. Los cerdos se pueden inmunizar con los agentes interferen para 1) inmunizar a estos cerdos CF con un polipéptido u otro agente inmunogénico, induciendo de ese modo la formación de anticuerpos que erradicarán las biopelículas bacterianas en los pulmones (de forma similar a cómo los anticuerpos frente a las biopelículas erradicadas por IHF residentes dentro de los oídos medios de chinchillas después de inmunización activa como se muestra en el Experimento N.º 1, para suministrar anti-IHF (u otro agente interferente) a los pulmones de estos animales por nebulización para evaluar la mejoría de los signos de enfermedad y las patologías asociadas.

Experimento N.º 7

Los solicitantes también proporcionan un modelo preclínico para la tuberculosis (TB). Véase Ordway *et al.* (2010) Anti. Agents and Chemotherapy 54: 1820. El microorganismo *Mycobacterium tuberculosis* es responsable de una epidemia mundial creciente. Las cifras actuales sugieren que hay aproximadamente 8 millones de casos nuevos de TB y aproximadamente 2,7 millones de muertes debidas a TB al año. Además del papel de este microbio como coinfección de individuos con VIH (de los ~45 millones de infectados con VIH, se calcula que ~1/3 también están coinfectados con *M. tuberculosis*), es particularmente problemático ya que los aislados se han vuelto altamente resistentes a múltiples fármacos y no se ha introducido ningún fármaco nuevo para la tuberculosis en más de un cuarto de siglo. En este modelo animal, los cobayas SPF se mantienen en una colonia de barrera y se infectan mediante pulverización en aerosol para administrar ~ 20 cfu de bacilos de la cepa Erdman K01 de *M. tuberculosis* en sus pulmones. Los animales se sacrifican con determinación de carga bacteriana y recuperación de tejidos para evaluación histopatológica los días 25, 50, 75, 100, 125 y 150 días después de la estimulación. A diferencia de los ratones que no desarrollan signos clásicos de TB, los cobayas estimulados de esta manera desarrollan granulomas bien organizados con necrosis central, una característica distintiva de la enfermedad humana. Además, al igual que los seres humanos, los cobayas desarrollan linfadenitis piogranulomatosa y necrotizante grave de los ganglios linfáticos drenantes como parte del complejo de la lesión primaria. El uso de este modelo proporcionará un examen preclínico para confirmar e identificar estrategias terapéuticas y preventivas para la reducción y/o eliminación de las biopelículas resultantes de *M. tuberculosis* que se ha observado que se forman en los pulmones de estos animales después de la estimulación y se cree que contribuyen tanto a la patogénesis como a la cronicidad de la enfermedad.

Experimento N.º 8

Se conocen múltiples modelos animales de infecciones con biopelícula con catéter/dispositivo permanente. Véase Otto (2009) Nature Reviews Microbiology, 7: 555. Aunque generalmente se considera una flora de la piel normal, el microbio *Staphylococcus epidermidis* se ha convertido en lo que muchos consideran un patógeno oportunista fundamental, ocupando el primer lugar entre los agentes causales de infecciones nosocomiales. Principalmente, esta bacteria es responsable de la mayoría de las infecciones que se desarrollan en dispositivos médicos permanentes que se contaminan con este colonizador de piel común durante la inserción del dispositivo. Aunque normalmente no suele ser mortal, la dificultad asociada con el tratamiento de estas infecciones por biopelículas, junto con su

frecuencia, los convierte en una carga grave para la salud pública. Los costes actuales asociados con el tratamiento de infecciones del torrente sanguíneo asociadas al catéter vascular solo que se deben a *S. epidermidis* ascienden a 2 mil millones de dólares al año en Estados Unidos. Además de *S. epidermidis*, *E. faecalis* y *S. aureus* también son contaminaciones encontradas en dispositivos médicos permanentes. Existen varios modelos animales de infecciones por *S. epidermidis* asociadas a catéteres, incluyendo conejos, ratones, cobayas y ratas, todos los cuales se usan para estudiar los mecanismos moleculares de patogénesis y que se prestan a estudios de prevención y/o terapéutica. Los catéteres de vena yugular de rata se han usado para evaluar terapias que interfieren con la formación de biopelículas de *E. Faecalis*, *S. aureus* y *S. epidermidis*. La reducción de la biopelícula a menudo se mide de tres maneras: (i) someter a ultrasonidos el catéter y calcular las CFU, (ii) cortar trozos de catéter o simplemente colocarlo en una placa y hacer la puntuación, o (iii) la biopelícula se puede teñir con violeta cristal u otro tinte, eluir, y medir la DO como un proxy para las CFU.

Experimento N.º 9

Los métodos que se describen en el presente documento se pueden usar para provocar respuestas inmunitarias en humanos y animales. Las composiciones inmunogénicas se pueden administrar a sujetos humanos y animales en presencia de adyuvantes tales como, pero no limitados a, sales de aluminio y liposomas. Los expertos en la materia entenderán que también se puede usar cualquier número de adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones inmunogénicas se pueden administrar a un sujeto humano o animal por vía intramuscular, por vía subdérmica, por vía intranasal, o por cualquier otra vía adecuada. Las composiciones inmunogénicas se pueden preparar de una manera coherente con el modo de administración seleccionado. Las composiciones inmunogénicas pueden tomar la forma de polipéptidos, ácidos nucleicos, o una combinación de los mismos, y pueden comprender antígenos parciales o de longitud completa. Además o alternativamente, las composiciones inmunogénicas pueden tomar la forma de APC pulsadas con un antígeno particular, o APC transfectadas con uno o más polinucleótidos que codifican un antígeno particular. La administración puede comprender una dosis única de una composición inmunogénica, o una administración inicial, seguida de una o más dosis de refuerzo. Las dosis de refuerzo se pueden administrar un día, dos días, tres días, una semana, dos semanas, tres semanas, uno, dos, tres, seis o doce meses, o en cualquier otro momento después de una dosis inicial. Una dosis de refuerzo se puede administrar después de una evaluación del título de anticuerpos del sujeto.

Experimento N.º 10

Los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para conferir inmunidad pasiva a un sujeto no inmune. La inmunidad pasiva frente a un antígeno dado se puede conferir a través de la transferencia de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que reconocen específicamente o se unen a un antígeno particular. Los donantes y receptores de anticuerpos pueden ser sujetos humanos o no humanos. Además o alternativamente, la composición de anticuerpo puede comprender un polinucleótido recombinante o aislado que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce específicamente o se une a un antígeno particular.

Se puede conferir inmunidad pasiva en los casos en los que la administración de composiciones inmunogénicas presenta un riesgo para el sujeto receptor, el sujeto receptor está inmunocomprometido o el sujeto receptor requiere inmunidad inmediata. Las composiciones inmunogénicas se pueden preparar de una manera coherente con el modo de administración seleccionado. Las composiciones pueden comprender anticuerpos completos, fragmentos de unión a antígeno, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos generados *in vivo*, anticuerpos generados *in vitro*, anticuerpos purificados o parcialmente purificados, o suero completo. La administración puede comprender una dosis única de una composición de anticuerpos, o una administración inicial seguida de una o más dosis de refuerzo. Las dosis de refuerzo se pueden administrar un día, dos días, tres días, una semana, dos semanas, tres semanas, uno, dos, tres, seis o doce meses, o en cualquier otro momento después de una dosis inicial. Una dosis de refuerzo se puede administrar después de una evaluación del título de anticuerpos del sujeto.

Experimento 11

Los miembros de la familia DNABII son altamente pleiotrópicos para múltiples sistemas de nucleoproteína, incluyendo la transcripción génica, y además, a menudo son esenciales. Por el contrario, los mutantes tanto HU como IHF se han generado en cepas de laboratorio de *E. coli* estudiadas ampliamente. Para determinar qué papel tienen IHF y HU en la formación de ADNe, las biopelículas formadas por la cepa MG1655 de *E. coli* o sus derivados deficientes de HU e IHF se incubaron con anti-IHF (preparado como se describe en Granston y Nash (1993) *J. Mol. Biol.*, 234: 45-59. Como se muestra en la Figura 8, aunque el aislado parental, la cepa MG1655 produjo una biopelícula robusta *in vitro* (Panel A), ambas cepas mutantes HU y IHF fueron menos robustas (Paneles C y E, respectivamente). Un mutante con deficiencia de HU produjo una biopelícula que tenía aproximadamente 1/2 la altura de la biopelícula de tipo silvestre, mientras que las cepas con deficiencia de IHF produjeron una biopelícula que tenía aproximadamente 2/3 de la altura del aislamiento parental. Este resultado sugería que ambas proteínas estaban involucradas en cualquiera de las la producción y/o la integridad de EPS de biopelícula de *E. coli*. Después del tratamiento con anti-IHF, la biopelícula formada por el aislado de tipo silvestre no mostró reducción de volumen notable y un porcentaje de reducción medio de un 58,1 % de altura, una reducción de un 73,1 % del porcentaje de biomasa y una reducción del grosor medio de un 87 % (Panel B), mientras que la formada por el mutante HU no

mostró reducción de la altura y solo una reducción de un 30,9 % de la biomasa y una reducción de un 37,2 % del grosor medio (Panel D). Por el contrario, no se observó ningún efecto sobre la biopelícula formada por el mutante IHF en términos de pérdida de altura (reducción de -3,4 %), biomasa (reducción de -20,5 %) o grosor medio (reducción de -19,8 %) (Panel F). En conjunto, estos datos indican que para esta cepa de *E. coli*, el IHF fue probablemente el único elemento estructural que podría ser el objetivo del uso del anticuerpo anti-IHF. Dado que hasta la fecha solo se ha observado el ADN entretejido altamente estructurado en biopelículas que se han formado *in vivo*, la confirmación de la expresión del miembro de la familia DNABII restante por cada mutante respectivo y cualquier cambio en la estructura de ADN resultante espera un análisis de inmunofluorescencia *in vivo*.

Experimento 12

Aunque en la presente solicitud se demostró *in vitro* e *in vivo* que tanto el anti-IHF como el uso de IHF como inmunógeno muestran utilidad en la reducción de biopelículas y/o la resolución de la enfermedad por biopelículas respectivamente, no se sabía si la reducción de biopelículas de NTHI con anti-IHF también podía permitir sinergia cuando se usa en conjunto con otras modalidades terapéuticas. Con este fin, se evaluó la capacidad de inducir una desestabilización estructural aumentada de biopelículas de NTHI formadas previamente cuando se usó una concentración subóptima de anti-IHF junto con uno de cada uno de los tres reactivos únicos. Estos tres reactivos incluyen 1) una enzima que degrada el ADN (ADNasa) que se sabe que es capaz de degradar una biopelícula de NTHI *in vitro* (pero aquí se usa a una concentración subóptima), 2) antisueros para una proteína de membrana externa de NTHI que no desestabilizó una biopelícula de NTHI formada previamente cuando se usa solo (anti-OMP P5) (los datos no se muestran), y 3) un antibiótico que generalmente se usa como una opción de primera línea en niños con OM crónica y/o recurrente (amoxicilina) pero que tiene una eficacia limitada frente a las bacterias residentes dentro de una comunidad de biopelículas.

La Figura 14A muestra que el tratamiento de una biopelícula de NTHI con una concentración de ADNasa que se muestra subóptima tiene un efecto marginal (véase 14A II). Del mismo modo, una dilución a 1:200 de anti-IHF tuvo poco efecto sobre la biopelícula de NTHI formada previamente (véase 14A III). Sin embargo, por el contrario, cuando estos dos reactivos se usaron en conjunto, la biopelícula disminuyó notablemente (véase 14A IV). Después de repetir este experimento tres veces, los investigadores encontraron que el efecto sinérgico más notable de la reducción de la biopelícula se midió como una disminución de la altura. La Tabla 7 que sigue a continuación muestra estos resultados.

Tabla 7

	ADNasa	Anti-IHF	ADNasa + anti-IHF	
Altura máx. (µm)	3,9	37,3	51,0	Ensayo 1
Altura máx. (µm)	-11,5	16,4	37,7	Ensayo 2
Altura máx. (µm)	-1,6	19,4	38,7	Ensayo 3

Una explicación simple para este resultado fue que a medida que la proteína DNABII se estaba titulando lejos de la periferia de la biopelícula, el ADN se hacía más accesible a la acción de la ADNasa.

La Figura 14B muestra los resultados del tratamiento con anti-OMP P5 en biopelículas de NTHI formadas previamente. Aunque este antisuero es fuertemente reactivo con OMP P5 de NTHI aislado (los datos no se muestran) y además, la inmunización activa con OMP P5 aislado es capaz de mediar una protección significativa frente a la OM experimental en modelos de chinchilla (véase por ejemplo 25. Bakaletz *et al.*, (1997) *Vaccine* **15** (9): 955-961; Bakaletz *et al.*, (1999) *Infect Immun* **67** (6): 2746-2762; Kennedy *et al.*, (2000) *Infect Immun* **68** (5): 2756-2765; Kyd JM, *et al.*, (2003) *Infect Immun* **71** (8): 4691-4699; Novotny LA, *et al.*, (2000) *Infect Immun* **68** (4): 2119-2128; Novotny LA, *et al.*, (2002) *Vaccine* **20** (29-30): 3590-3597 y Novotny LA, *et al.*, (2003) *J Immunol* **171** (4): 1978-1983) este antisuero no induce un cambio en la estructura/integridad de una biopelícula de NTHI que se había formado *in vitro* cuando se usó a una dilución de 1:50 (véase 14B II). Del mismo modo, se observó un efecto marginal cuando estas biopelículas se incubaron con una dilución subóptima de anti-IHF (aquí usada a una dilución a 1:100) (véase 14B I). Sin embargo, cuando se combinan, el uso de anti-P5 más anti-IHF dio como resultado una reducción de la altura de la biopelícula que superaba la suma de los dos antisueros cuando se usaban solos (véase 14B III), indicando de ese modo un resultado sinérgico. Por lo tanto, se llevó a la conclusión de que el uso de anti-IHF para desestabilizar la matriz NTHI EPS daba como resultado la exposición de la proteína de la superficie de la célula bacteriana dirigida (por ejemplo, OMP P5) que de otro modo podría quedar oscurecida por el ADN si como quizás otros componentes de EPS, permitiendo de ese modo la eliminación bacteriana mediada por el sistema inmunológico por mecanismos aún desconocidos.

Por último, la Figura 14C muestra los resultados del tratamiento de biopelículas de NTHI formadas previamente con amoxicilina. Cuando se usa a una concentración de 64 µg/ml, la amoxicilina no tuvo un efecto mensurable en la

arquitectura de las biopelículas de NTHI formadas previamente (véase 14C II) a pesar de la evidencia de muerte celular bacteriana limitada. El tratamiento con antisueros IHF a una dilución 1:50 redujo sustancialmente la altura de la biopelícula como se ha mostrado anteriormente (véase 14C III). De forma interesante, sin embargo, cuando los dos reactivos se usaron simultáneamente, no solo hubo una reducción espectacular de la altura de la biopelícula (véase 14C IV), sino que el uso de un tinte vital indicó que la mayoría de las bacterias que quedaban en la biopelícula ahora estaban muertas. Como lo señala la fluorescencia predominante en el canal rojo dentro de la biopelícula de la que se forma la imagen. Este resultado mostró que la reducción de volumen de la biopelícula con anti-IHF probablemente expuso las bacterias lo suficiente como para crear condiciones más parecidas a la susceptibilidad a las concentraciones de amoxicilina que se sabe que son eficaces cuando se analizan frente a NTHI planctónico. Este resultado puede haber sido mediado por una mayor exposición física de las bacterias dentro de la matriz de biopelícula restante a la acción de la amoxicilina y/o mediante una mayor liberación de bacterias en la fase planctónica, como mostraron anteriormente los investigadores, y puede producir durante la reducción de la biopelícula por exposición a anticuerpos anti-IHF (véase la Fig. 4).

Experimento 13

Los solicitantes han mostrado que la inducción de anticuerpos anti-IHF por inmunización transcutánea es eficaz para resolver biopelículas inducidas por NTHI dentro del oído medio de la chinchilla. También se demostró que el uso de IHF nativo es esencial para la inducción de una respuesta inmunológica protectora, ya que cuando está unido al ADNe, parece que los epítomos protectores se han enmascarado como se muestra después de la inmunización con TCI y SQ. Sin embargo, el diseño racional de los candidatos a vacuna que probablemente tendrá una amplia eficacia protectora requiere una comprensión detallada de los epítomos inmunodominantes y/o protectores de esa proteína, que de hecho puede no ser evidente ni necesariamente continua. Las estrategias actuales de diseño de candidatos a vacunas son más reduccionistas en su enfoque, y a menudo apuntan a identificar y usar solo esa parte de la proteína diana que es absolutamente necesaria para la inducción de alta avidez y anticuerpos protectores. Para esta finalidad, la formación de mapas de epítomos se lleva a cabo para determinar el inmunógeno más eficaz.

La formación de mapas de epítomos se puede llevar a cabo como se describe en Novotny, *et al.*, (2009) *Vaccine* 28 (1): 279-289 y de acuerdo con el siguiente procedimiento. Para generar suero inmune, las Chinchillas se pueden inmunizar por vía parenteral mediante inyección subcutánea (SQ) de 10 µg de la proteína IHF nativa, un polipéptido de los 20 aminoácidos C-terminales de IHFα, un polipéptido de los 20 aminoácidos C-terminales de IHFβ, un polipéptido de los aminoácidos 60-76 de TBP-DNABII administrados de forma conjunta con el adyuvante monofosforil lípido A (MPL; Corixa) o con MPL solo (cohorte de control solo adyuvante). Se pueden administrar dos refuerzos idénticos a 21 intervalos de días. La sangre se puede recoger para suero 10 días después de recibir la dosis de inmunización final. El ensayo de inmunoabsorción relacionado con enzimas (ELISA) y antisueros de transferencia de Western de chinchilla se pueden llevar a cabo. Para ELISA, los sueros se pueden analizar en un formato de placa de 96 pocillos frente al inmunógeno administrado (0,2 µg de proteína/pocillo). El título se puede definir como el recíproco de la dilución del suero que produjo un valor de DO450 de 0,1 mayor que los pocillos de control que contienen todos los componentes excepto el suero. Los ensayos ELISA se pueden llevar a cabo un mínimo de tres veces y los resultados se informan como la media geométrica. La transferencia de Western se puede llevar a cabo frente a 1 µg del inmunógeno respectivo usando suero inmune diluido a 1:100 y detectado con HRP-proteína A (Zymed, South San Francisco, CA). El color se desarrolló con sustrato CN/DAB (Pierce, Rockford, ILLINOIS).

Una serie de péptidos sintéticos de 20 meros se pueden sintetizar con una superposición de 5 restos con el fin de formar mapas de epítomos de la proteína IHF de NTHI. La síntesis, la purificación y la confirmación de la secuencia de todos los péptidos sintéticos se pueden llevar a cabo de acuerdo con técnicas convencionales (véase por ejemplo Bakaletz LO. *et al.*, (1997) *Infect. Immun.* 71 (8):4691-9 y Bakaletz LO., *et al.*, (2001) *Vaccine* 68 (4): 2119-28). El análisis de aminoácidos y el análisis espectral de masas se pueden usar para confirmar la pureza, la composición y la secuencia de aminoácidos de cada péptido.

El análisis de la interacción entre péptidos sintéticos y anticuerpos presentes en los sueros, se puede examinar usando un instrumento Biacore 3000 como se ha descrito y todos los reactivos se pueden adquirir en Biacore (Uppsala, Suecia). En resumen, los péptidos se pueden suspender en tampón de acetato sódico, antes de la inmovilización en la superficie de un chip sensor CM5 de calidad reactiva activado usando química de acoplamiento de amina. Para el análisis de interacción, 15 µl de suero (diluido a 1:2 en tampón HBS-EP más 1 mg de carboximetildextrano/ml) se pueden inyectar a través de la superficie del chip del sensor a un caudal de 5 µl/ min. La cantidad relativa de anticuerpo específico de antígeno o de inmunógeno en cada muestra se puede calcular como la diferencia en unidades de resonancia (RU) obtenidas 5 segundos antes y 45 segundos después de poder inyectar cada muestra. La superficie del chip sensor se puede regenerar entre muestras con NaOH 25 mM. Los péptidos sintéticos con la interacción más fuerte con los anticuerpos presentes en los sueros pueden ser los candidatos más prometedores de epítomos protectores capaces de inducir anticuerpos protectores de alta avidez *in vivo*.

El antisuero policlonal de conejo se puede generar frente a los péptidos más inmunogénicos de la formación de mapas de epítomos. Este antisuero se puede usar para purificar por afinidad los anticuerpos neutralizantes de los anticuerpos no neutralizantes mediante cromatografía en columna. Para ello, se puede usar tanto el antisuero

policlonal de conejo como el de chinchilla (se ha mostrado que este último es protector). Los sueros se pueden analizar tanto antes como después de desarrollar cada uno sobre una columna a la que se unió el IHF nativo o al que se ha unido el IHF mezclado previamente con ADN. Solo los anticuerpos que no se unen al complejo ADN-IHF deben ser neutralizantes. Todos los antisueros eluidos a través del flujo se analizarán frente a los grupos de antisuero originales a través del ensayo de biopelícula *in vitro* de los investigadores para determinar la capacidad relativa de eliminar la biopelícula de NTHI, así como a través de ensayos de ELISA, transferencia de Western y de biosensor para determinar la especificidad y el título. Como ensayo adicional, los candidatos a vacunas dirigidas al epítipo se pueden unir a la columna para determinar si pueden eliminar los anticuerpos que ahora se ha demostrado que son neutralizantes.

Se debe entender que aunque la invención se ha descrito en conjunto con las realizaciones mencionadas anteriormente, los ejemplos y la descripción mencionados anteriormente pretenden ilustrar y no limitar el ámbito de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del ámbito de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a la que pertenece la invención.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Todas las secuencias de nucleótidos proporcionadas en el presente documento se presentan en la dirección 5' a 3'. Las invenciones descritas de forma ilustrativa en el presente documento se pueden poner en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no desvelados específicamente en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc., se leerán de manera expansiva y sin limitación.

Además, cuando las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos de Markush, los expertos en la materia reconocerán que la invención también se describe de ese modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

TABLA 8

Gram (+) - solo HU, Gram (-) - todas tienen HU algunas también IHF

Cepa bacteriana	Abreviatura	Nombre(s) de proteínas	(HU) (sin secuenciar completamente)
<i>S. sobrinus</i> 6715	Ss	1310	(HU)
<i>S. pyogenes</i> MGAS1027 0	Spyog	Spy1239	(HU)
<i>S. gordonii</i> Challis NCTC7868	Sg	SGO_0701	(HlpA)
<i>S. agalactiae</i> (Strep. Grupo B) 2603V/R	GBS	SAG_0505	(Hup)
<i>S. mutans</i> UA159	Sm	Smu_589	(HU)
<i>S. pneumoniae</i> R6	Spneu	spr1020	(HU)
<i>S. gallolyticus</i> UCN34 (<i>S. bovis</i>)	Sgall	YP_003430069	(HlpA)
<i>S. aureus</i> MW2	Sa	MW1362	(HU)
<i>S. epidermidis</i> RP62A	Se	SERP1041	(Hup)
<i>E. coli</i> K12-MG1655	Ec	b1712	(HimA)
		b0912	(HimD)
			(HupA)
			(HupB)
<i>H. influenza</i> KW20 Rd	Hi	HI1221	(HimA)
		HI1313	(HimD)
		HI0430	(HupA)
<i>Salmonella</i> entérica serovar typhi CT18	Salm	Sty1771	(HimA)
		Sty0982	(HimD)
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D11S-1	Aa	YP_0032555965	(IHfAlfa)
		YP_003256209	(IhfB)
		YP_003255304	(HU)
<i>P. gingivalis</i> W83	Pg	PG_0121	(Hup-1)
		PG_1258	(Hup-2)
<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090 (Oklahoma)	Ng	NGO603	(IHf(3))

TABLA 8 (CONTINUACIÓN)

<i>N. meningitidis</i> MC58	<i>Nm</i>	NGO030	(IHFa)
		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)
		VC_1222	(HimA)
<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424	<i>Be</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> CDC1551	<i>Mtb</i>	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 palladium</i> Nichols	<i>Tp</i>	TP_0251	(Proteína de unión a ADN II)
<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)

TABLA 8 (CONTINUACIÓN)

<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	<i>Bpert</i>	PIN_0345	(HimA)
		PIN_0343	(Proteína hipotética)
		BP2572	(IhfA)
		BP3530	(HupB)
		BP0951	(IhfB)
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	<i>Ef</i>	Ef1550	(hup)

9A	9A (cont.)
----	---------------

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

Ec_HimA	-----MALTKAEMSEYLFDKLG-LS-----KRD	AKELVELFFEEIRRALEN
Salm_HimA	-----MALTKAEMSEYLFDKLG-LS-----KRD	AKELVELFFEEIRRALEN
Vc_HimA	-----MALTKAELAEALFEQLG-MS-----KRD	AKDTVEVFFEEIRKALES
Pa_HimA	-----MGALTKAEIAERLYEELG-LN-----KRE	AKELVELFFEEIRQALEH
Hi_HimA	-----MATITKLDIIEYLSDKYH-LS-----KQD	TKNVVENFLEEIRLSLES
Aa_IHFalpha	-----MTLTKVELAENLIEKFH-LS-----KRE	AKDLVESFFEEIRVALET
Mc_HimA	-----MGALTKADMVDELTIRLR-LT-----RQO	ARKLVDGFFEEISQSLAQ
Ng_IHFalpha	-----MTLTKAELADILVDKVSNT-LS-----KND	AKEIVELFFEEIRSTLAS
Nm_HimA	-----MTLTKAELADILVDKVSNT-LS-----KND	AKEIVELFFEEIRSTLAS
Bc_IHFA	+30aaASTE-TPTLTKAELAEELLFDSVG-LN-----KRE	AKDMVEAFFEVIRDALEN
Bp_IHFA	+27aaTSAGDTPTLTKAELAEELLFDSVG-LN-----KRE	AKDMVEAFFEVIRDALEN
Bpert_IhfA	MGTMTLAEPRTLTKAELAEELLFERVG-LN-----KRE	AKDIVDTFFEEIRDALAR
Pm_HimA	-----MNNKEFIAALAAARTGYT-----QDE	SQKMVKTVVDMMGKSFET
Pi_HimA	-----MNNKEFITALANRVGRS-----QDE	TQKLVKTALQAMGDNFES
Tp_Dbp II	-----MKRVRRTRSFWDALCDEVLS-----RHH	VARVDSFVSVVTAALER
Pm_Hup	-----MAKSAIQLITSALAKQHNLS-----ADD	AAAFVDAFFDIISSELKN-
Pi_hypo	-----MAKTALQLIADAVAKKHKIT-----VKE	AEKFVSAIFDVVNEGLKT
Sa_HU	-----MNTDLINAVAEQADLT-----KKE	AGSAVDVAFESIQLSLAK
Ec_hupA	-----MNTQLIDVIAEKAELS-----KTQ	AKAALESTLAAITESLKE
Se_Hup	-----MNTDLINAVAEQADLT-----KKE	AGSAVDVAFESIQLSLAK
Ss_Hu	-----MANKQDLIAKVAEATELT-----KKD	SAAAVDVFSSIEGFLSK
Spyog_HU	-----MANKQDLIAKVAEATELT-----KKD	SAAAVDAVFSTIEAFLAE
Sgall_HlpA	-----MANKQDLIAKVAEATELT-----KKD	SAAAVDAVFSAIESFLSE
GBS_Hup	-----MANKQDLIAKVAEATELT-----KKD	SAAAVDAVFSAVADYLAE
Spneu_HU	-----MANKQDLIAKVAEATELT-----KKD	SAAAVEAVFAAVADYLAA
Sg_HlpA	-----MANKQDLIAKVAEATELT-----KKD	SAAAVDAVFSAVTEYLSK
Sm_HU	-----MANKQDLIAKVAEATELT-----KKD	SAAAVDAVFSAVSSYLAK
Ef_Hup	-----MANKAELIENVASSTGLT-----KKD	ATAAVDAVFSTIQETLAK
Hi_HupA	-----MNTDLIDAIANAELN-----KKQ	AKAALEATLDAITASLKE
Vc_HupA	-----MNTQLIDFIAEKADLT-----KVQ	AKAALEATLGAVEGALKD
Pa_HupB	-----MNTSELIDAIASADIP-----KAV	AGRALDAVIESVTGALKA

Tabla 9A1

 α -1

Giro

 α -2

T

GEQVKLSGFGNFDLRDKNQRP-GRNPQTGEDIPITARRVVTFRPGQKLKSRVENASPKDE-
 GEQVKLSGFGNFDLRDKNQRP-GRNPQTGEDIPITARRVVTFRPGQKLKSRVENASPKKE-
 GEQVKLSGFGNFDLRDKNERP-GRNPQTGEDIPITARRVVTFRPGQKLKARVENIKVEK--
 NEQVKLSGFGNFDLRDKRQRP-GRNPQTGEEIPITARRVVTFRPGQKLKARVEAYAGTKS-
 GQDVKLSGFGNFELRDKSSRP-GRNPQTGDVVPVSARRVVTFKPGQKLRRARVEKTK-----
 GNDVKLSGFGNFELRDKASRP-GRNPQTGESVPVSARRVVVFKPGQKLNRNVEKVKPKA-
 GHEVKLSGFGNFELKDKKPRP-GRNPQTGESVPIQARRVVTFKAGQKLRGWIDSQNEG
 GEEIKISGFGNFQLRDKPQRP-GRNPQTGEEVPITARRVVTFHASQKLKGMVEHYDYKQR-
 GEEIKISGFGNFQLRDKPQRP-GRNPQTGEEVPITARRVVTFHASQKLKSMVEHYDYKQR
 GESVKLSGFGNFQLRDKPQRP-GRNPQTGEAIPIAARRVVTFHASQKLKALVENGAE
 GESVKLSGFGNFQLRDKPQRP-GRNPNTGEAIPIAARRVVTFHASQKLKALVENGAEPLAR
 GDSVKLSGFGNFQVRDKPPRP-GRNPQTGETIPIAARRVVTFHASQKLKSVVEQPNSPDPASAE
 GDPVPVIGFGTFEVKKRLERV-MVNPSTGLRMLVPPKLVLNFKPAATIKGHVRKGGQDNG
 GEPVLVSGFGSFEVKKRLERI-MTNPATGLRMLVPPKLVLNFRATASVKEKLKKGAE
 GETVELRDFGVFESVRKASV-GKSINTGEVVSIPSHCVVFRPSKRLKSAVRCYRSGEVGAD
 GNQVKIKGLGTFKVQAVKPR-ESVNVNIGERVLIEGHDKISFTPTDVMKELVNKPFSQFET +354aa
 DKLVKVKGLGTFKVQAVKPR-ESVNVNIGERVLIEGHEKVSFTPDATMKELVNKPFAQFET +283aa
 GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNPQTGKEIDIPASKVPAFKAGKALKDAVK-----
 GDAVQLVGFGTFKVNHRART-GRNPQTGKEIKIAAANVPAFVSGKALKDAVK
 GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNPQTGKEIDIPASKVPAFKAGKALKDAVK-----
 GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNPQTGAIEIKIAASKVPAFKAGKALKDAVK-----
 GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNPQTGAIEIEIAASKVPAFKAGKALKDAVK-----
 GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNPQTGEEIEIAASKVPAFKAGKALKDAVK-----
 GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNPQTGAIEIEIAASKVPAFKAGKALKDAVK-----
 GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNPQTGKEMTIAASKVPAFKAGKALKDAVK-----
 GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNPQTGKEIKIAASKVPAFKAGKALKDAVK-----
 GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNPQTGEEIKIKASKVPAFKAGKALKDAVK-----
 GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNPQTGOEIQIAASKVPAFKPGKALKDAVK
 GEPVQLIGFGTFKVNHRART-GRNPQTGAIEIQIAASKVPAFVSGKALKDAIK-----
 GDQVQLIGFGTFKVNHRART-GRNPQTGEEIKIAAANVPAFVAGKALKDAIK-----
 GDSVVLVGFGTFKVKERAART-GRNPQTGKPIKIAAAKIPGFKAGKALKDAVN-----

Dominio de Cadena de
 β-1 T β-2 unión Giro retorno β-3 α-3
 ----- BRAZO -----

Tabla 9A1 (continuación)

9A2	9A2 (cont.)
-----	----------------

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

Aa HU	-----M N KTDLIDAIASSAELN-----K K QAKAALEATLDAITGSLKK
Vc_HupB	-----M N KTQLVEQIAANADIS-----KASAGRALDAFIEAVSGTLQS
Ec_hupB	-----M N KSQLIDKIAAGADIS-----KAAAGRALDAIIASVTESLKE
Mc_HupB	-----M N KSELVDSIAQSAGLT-----KEQAAKAVNAFTESVQGALQR
	α-1 Giro α-2 T

Tabla 9A2

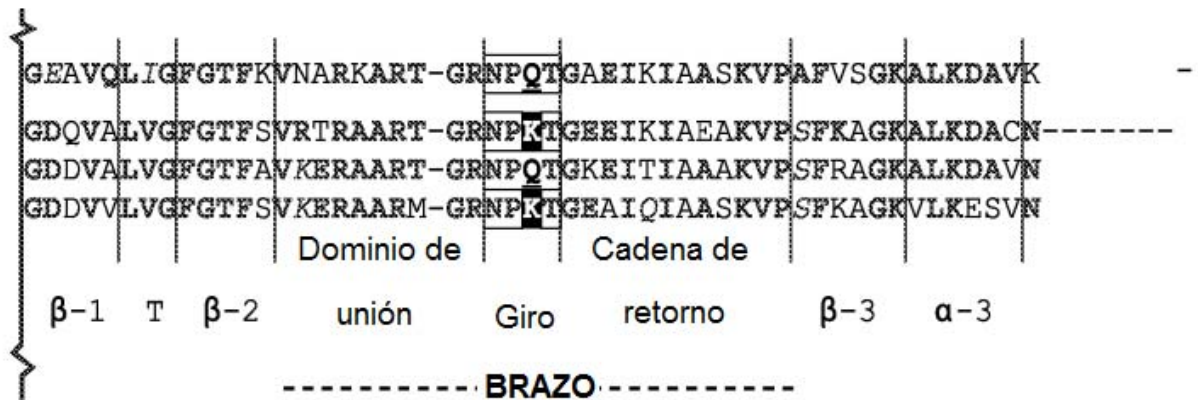


Tabla 9A2 (continuación)

9A3	9A3 (cont.)
-----	----------------

SEQ ID NOS: 77-100, respectivamente, en orden de aparición

Bpert HupB	-----MNKTELIDHIAASKADIS-----KAAAGRSLDALIGAVKTTLLKK
Mc HimD	----MQAVINKSNLIANLASVCEEL----EEDVVDEAVRLMIAMMVNELVY
Pm HupB	-----MNKTELIEKIAANA EVS-----KAAAKKALDATTEAIKEALAA
Pi Hup	-----MNKTELIEKIAAGAGLS-----KADSKKALDAMTAAIKEALVA
Td HU	-----MKQKRSKIDIIDSVYRNNPQYQLKCINAIANLFLDELSVLLQQG
Pg_Hup-1	-----MNKTDFIAA VA EKANLT-----KADAQRAVN AFAEVVTEQMNA
Hp_Hup	-----MNKAEFIDL VKEAGKYS-----KREAE E AISAFTLAVETALSK
Pm HupA	-----MTKADIINEIATSTGIA-----KKDVS AVVESFMETIKDSLLE
Pi Hup-2	-----MTKADIINEIASSTGIS-----KKDVS AVVESFMDA IKDSLLE
Pg_Hup-2	-----MTKADV VNAIAKSTGID-----KETTLKVVESFMDTIKDSLSE
Mt HU	-----MNKAELIDVLTQKL GSD-----RQATAAVENVVDTIVRAVHK
Ms Hup	-----MNKAELIDVLTTRMGTD-----RQATAAVENVVDTIVRAVHK
Ec_HimD	-----MTKSELIERLATQOS-----HIPAKTVEDAVKEMLEHMASTLAQ
Salm_HimD	-----MTKSELIERLATQOS-----HIPAKAVEDAVKEMLEHMASTLAQ
Vc_HipB	-----MTKSELIERLCAEQT-----HLSAKEIEDAVKNILEHMASTLEA
Pa_HimD	-----MTKSELIERIVTHQG-----QLSAKDVELA IKTMLEQMSQALAT
Hi_HimD	-----MTKSELMEKLSAKQP-----TLPAKEIENMVKGILEFISQSLN
Aa IHFB	-----MTKSELIELLVQKNS-----NIPVKHVEEAVKAILEQMSYVLEH
Ng_IHFβ	-----MVRLAEVF AAKNGTHLLAKDVEYSVKVLVD TMTRSLAR
Nm HimD	-----MTKSELMVRLAEVF AAKNGTHLLAKDVEYSVKVLVD TMTRSLAR
Bc IHFB	-----MTKSELVAQLASRFP-----QLVLKDADFAVKTMLDAMSDALAK
Bp IHFB	-----MTKSELVAQLASRFP-----QLVLKDADFAVKTMLDAMSDALSK
Bpert IhfB	-----MTKSELIAALAA RYP-----QLAAARDTDYAVKTMLDAMTQALAS
Bb_Hbb	MSFSRRPKVTKSDIVDQISLNIKNNNL-KLEKKYIRLVIDAFFEELKSNLCS
	α-1 Giro α-2 T

Tabla 9A3

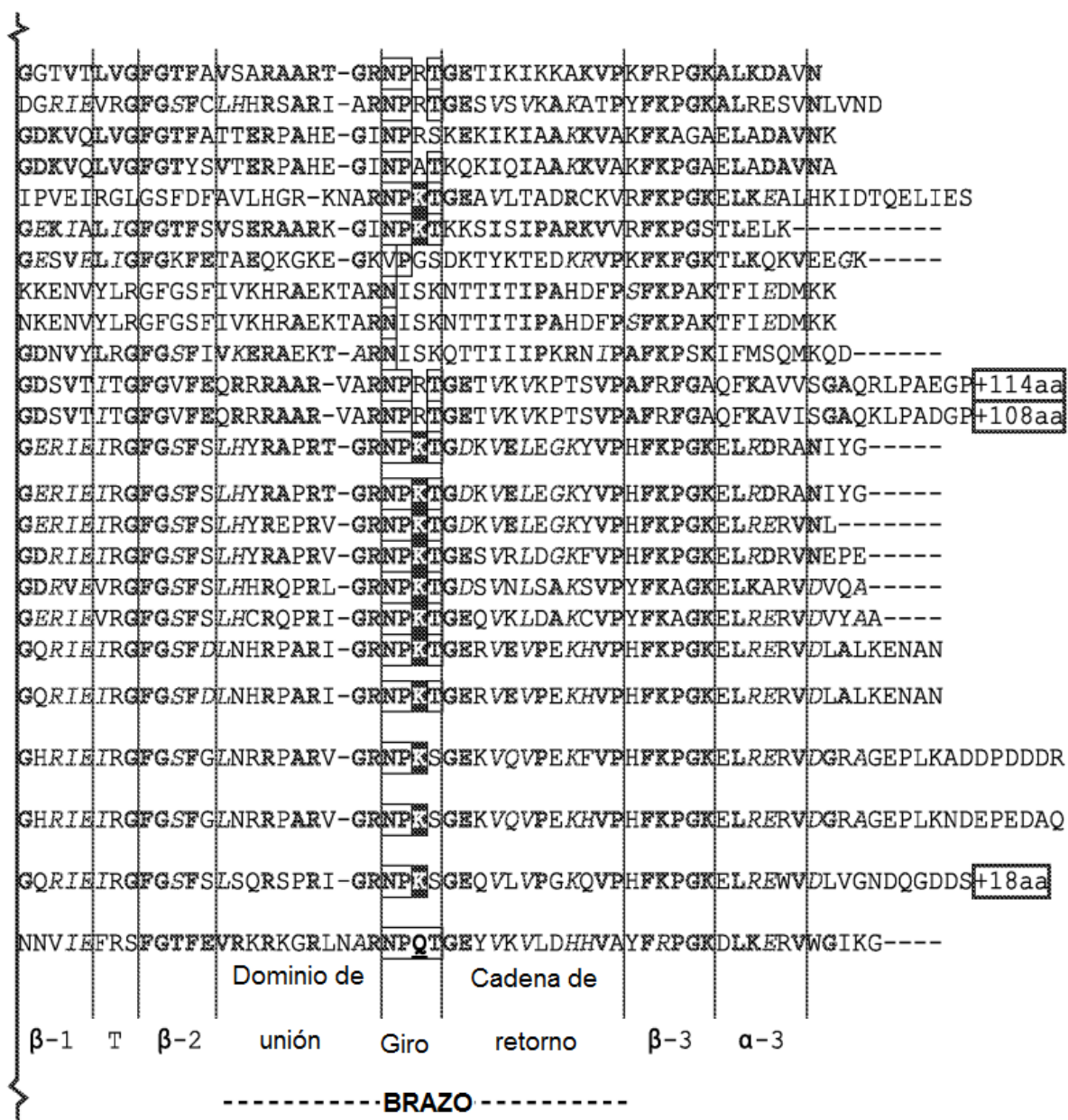


Tabla 9A3 (continuación)

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

Comparación con el motivo peptídico de 16 aa de Liuet *al.*

<i>Strep inter</i> HU	EVREERAARK-GRNPQTG
Ec_HimA	DLRDKNQRP-GRNPKTG
Salm_HimA	DLRDKNQRP-GRNPKTG
Vc_HimA	DLRDKNERP-GRNPKTG
Pa_HimA	DLRDKRQRP-GRNPKTG
Hi_HimA	ELRDKSSRP-GRNPKTG
Aa_IHFalpha	ELRDKASRP-GRNPKTG
Mc_HimA	ELKDKKPRP-GRNPKTG
Ng_IHFalpha	QLRDKPQRP-GRNPKTG
Nm_HimA	QLRDKPQRP-GRNPKTG
Bc_IHFA	QLRDKPQRP-GRNPKTG
Bp_IHFA	QLRDKPQRP-GRNPNTG
Bpert_Ihfa	QVRDKPPRP-GRNPKTG
Pm_HimA	EVKKRLERV-MVNPSTG
Pi_HimA	EVKKRLERI-MTNPATG
Tp_Dbp_II	ESRVRKASV-GKSIINTG
Pm_Hup	KVQAVKPR-ESVNVNTG
Pi_hypo	KVQAVKPR-ESVNVNTG
Sa_HU	EVREERAARK-GRNPQTG
Ec_hupA	KVNHRAERT-GRNPQTG
Se_Hup	EVREERAARK-GRNPQTG
Ss_Hu	EVREERAARK-GRNPQTG
Spyog_HU	EVREERAARK-GRNPQTG
Sgall_HlpA	EVREERAARK-GRNPQTG
GBS_Hup	EVREERAARK-GRNPQTG
Spneu_HU	EVREERAARK-GRNPQTG
Sg_HlpA	EVREERAARK-GRNPQTG
Sm_HU	EVREERAARK-GRNPQTG

Tabla 9B

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	KVNHRSAART-GRNPQTG
<i>Bpert</i> HupB	AVSARAART-GRNPQTG
<i>Pa</i> HupB	AVKERAART-GRNPQTG
<i>Aa</i> HU	SVRTAART-GRNPQTG
<i>Pm</i> HupB	ATTERPAHE-GINPRSK
<i>Pi</i> Hup	SVTERPAHE-GINPATK
<i>Td</i> HU	FAVLHGR-KNARNPKTG
<i>Pg</i> Hup-1	SVSERAARK-GINPKTK
<i>Hp</i> Hup	ETAQKGKE-GKVEGSD

Tabla 9B (continuación)

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



Comparación con el motivo peptídico de 16 aa de Liu *et al.*

<i>Pm</i> HupA	FIVKHRAEKTARNISK
<i>Pi</i> Hup-2	FIVKHRAEKTARNISK
<i>Pg</i> Hup-2	IVKERAECT-ARNISKQ
<i>Mt</i> HU	EQRRRAAR-VARNPRTG
<i>Ms</i> Hup	EQRRRAAR-VARNPRTG
<i>Ec</i> HimD	SLHYRAPRT-GRNPKTG
<i>Salm</i> HimD	SLHYRAPRT-GRNPKTG
<i>Vc</i> HipB	SLHYREPRV-GRNPKTG
<i>Ec</i> hupB	AVKERAART-GRNPQTG
<i>Mc</i> HupB	SVKERAARM-GRNPKTG
<i>Pa</i> HimD	SLHYRAPRV-GRNPKTG
<i>Hi</i> HimD	SLHHRQPRL-GRNPKTG
<i>Aa</i> IHFB	SLHCRQPRI-GRNPKTG
<i>Ng</i> IHFB	DLNHRPARI-GRNPKTG
<i>Nm</i> HimD	DLNHRPARI-GRNPKTG
<i>Ec</i> IHFB	GLNRRPARV-GRNPKSG
<i>Bp</i> IHFB	GLNRRPARV-GRNPKSG
<i>Bpert</i> IhfB	SLSQRSPRI-GRNPKSG
<i>Mc</i> HimD	CLHHRSAARI-ARNPRTG
<i>Bb</i> Hbb	EVRKRKGRLNARNPQTG

Tabla 9B (continuación)

TABLA 10 (SEQ ID NOS: 160-336, respectivamente, en orden de aparición)

Cepa bacteriana, nombre de proteína	Secuencia $\beta 3$	Secuencia $\alpha 3$	20 aa C-terminal
<i>S. pyogenes</i> MGAS1027 0, 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)2603V/R 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	AFVSGK	ALKDAIK	IAASKVPAFVSGKALKDAIK
<i>H. influenza</i> KW20 Rd HupA	AFVSGK	ALKDAVK	IAASKVPAFVSGKALKDAVK
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D11S-1 HU	AFVAGK	ALKDAIK	IAAANVPAFVAGKALKDAIK
<i>V. cholera</i> El Tor N16961, HupA	AFVSGK	ALKDAVK	IAAANVPAFVSGKALKDAVK
<i>E. coli</i> K12-MG1655 hupA	GEKAGK	ALKDAVN	IAAAKIPGEKAGKALKDAVN
<i>P. aeruginosa</i> HupB	SFRAGK	ALKDAVN	IAAAKVPSEFRAGKALKDAVN
<i>E. coli</i> K12-MG1655 hupB	SFKAGK	ALKDACN	IAEAKVPSFKAGKALKDACN
<i>V. cholera</i> El Tor N16961 HupB	KFRPGK	ALKDAVN	IKKAKVPKFRPGKALKDAVN
<i>Bordetella pertusis</i> Tohama 1 HupB	KEKAGA	ELADAVNK	AAKKVAKFKAGAEELADAVNK
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845 HupB	KEKPGA	ELADAVNA	AAKKVAKFKPGAELADAVNA
<i>Prevotella intermedia</i> 17 Hup	SFKAGK	VLKESVN	IAASKVPSFKAGKVLKESVN
<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4 HupB	RFKPGS	TLELK	ISIPARKVVRFKPGSTLELK
<i>P. gingivalis</i> W83 Hup-1	KEKPGK	TLKQKVEEGK	KRVPKFKPGKTLKQKVEEGK
<i>H. pylori</i> 2 6 69 Hup	SEKPAK	TFIEDMKK	PAHDFPSFKPAKTFIEDMKK
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845 HupA	SFKPAK	TFIEDMKK	PAHDFPSFKPAKTFIEDMKK
<i>Prevotella intermedia</i> 17 Hup-2	AFKPSK	IFMSQMKQD	KRNIPAFKPSKIFMSQMKQD
<i>P. gingivalis</i> W83 Hup-2	AFRPGA	QFKAVVSGAQRLEAGPAVKRG	AKRPATKAPAKKATARRGRK
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551 HU	AFRPGA	QFKAVISGAQKLPADGPAVKRG	TKAPAKKAAAKKAPAKKGRR
<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2 Hup	NFKPAA	TIKGHVRKGGQDNG	NFKPAAATIKGHVRKGGQDNG
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845 Hima	NFRATA	SVKEKLKGGAE	VLNFRATASVKEKLKGGAE
<i>Prevotella intermedia</i> 17 Hima	TFRPGQ	KLKSRVENASPKDE	TFRPGQKLKSRVENASPKDE
<i>E. coli</i> K12-MG1655 Hima			

(TABLA 10 CONTINUACIÓN)

<i>Salmonella entérica serovar typhi CT18</i> HimA	TERPGQ	KLKSRVENASPKKE	TERPGQKLKSRVENASPKKE
<i>V. cholera</i> El Tor N1696 HimA	TERPGQ	KLKARVENIKVEK	VTERPGQKLKARVENIKVEK
<i>P. aeruginosa</i> HimA	TERPGQ	KLKARVEAYAGTKS	TERPGQKLKARVEAYAGTKS
<i>Burkholderia cenocepacia</i> H/2424 IHFA	TFHASQ	KLKALVENGAE	RVVTFHASQKLKALVENGAE
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668 IHFA	TFHASQ	KLKALVENGAEPLDLAR	HASQKLKALVENGAEPLDLAR
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1 IhfA	TFHASQ	KLKSVVEQPNPPDPASAE	QKLKSVVEQPNPPDPASAE
<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090 (Oklahoma) IHFa	TFHASQ	KLKGMVEHYDDKQR	TFHASQKLKGMVEHYDDKQR
<i>N. meningitidis</i> MC58 HimA	TFHASQ	KLKSMVEHYDDKQR	TFHASQKLKSMVEHYDDKQR
<i>H. influenza</i> KW/20 Rd HimA	TEKPGQ	KLRLARVEKTK	RRVVTFKPGQKLRLARVEKTK
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D11S-1 HimA	VFKPGQ	KLRLNRVEKVKFKA	VVFKPGQKLRLNRVEKVKFKA
<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4 HimA	TEKAGQ	KLKGWIDSQNEG	VVTFKAGQKLKGWIDSQNEG
<i>Treponema palladium</i> Nichols Proteína de unión a ADN II	VFRPSK	RLKSAVRGYSGEVGAD	PSKRLKSAVRGYSGEVGAD
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845 Hup	SFTPDQ	VNKLNVNKPFSQFETVVINDGV	MQAGLTMKVPKVELRPEYRK
<i>Prevotella intermedia</i> 17 hipotética	SFTPDA	TMKELVNKPFQAQFETVVINDGV	SAGDTMKVPKVELRPEYRTK
<i>E. coli</i> K12-MG1655 HimD	HEKPGK	ELDRANIYG	KYVPHFKPGKELDRANIYG
<i>Salmonella entérica serovar typhi CT18</i> bHimD	HEKPGK	ELDRANIYG	KYVPHFKPGKELDRANIYG
<i>V. cholera</i> El Tor N1696 HipB	HEKPGK	ELRERVNL	EGKYVPHFKPGKELRERVNL
<i>P. aeruginosa</i> HimD	HEKPGK	ELDRVNEPE	KFVPHFKPGKELDRVNEPE
<i>H. influenza</i> KW/20 Rd HimD	YFKAGK	ELKARVDVQA	KSVPYFKAGKELKARVDVQA
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D11S-1 IHFB	YFKAGK	ELRERVVDVYAA	CVPYFKAGKELRERVVDVYAA
<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090 (Oklahoma) IHFβ	HEKPGK	ELRERVDLAKENAN	FKPGKELRERVDLAKENAN
<i>N. meningitidis</i> MC58 HimD	HEKPGK	ELRERVDLAKENAN	FKPGKELRERVDLAKENAN
<i>Burkholderia cenocepacia</i> H/2424 IHFB	HEKPGK	ELRERV/DGRAGEPLKADDPDDDR	ERV/DGRAGEPLKADDPDDDR
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668 IHFB	HEKPGK	ELRERV/DGRAGEPLKNDPEPDAQ	ERV/DGRAGEPLKNDPEPDAQ
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1 IhfB	HEKACK	ELREWVDLVGNDQGDSSNGSS	DSSNGSSDPLQSVMDHAMH
<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4 HimD	YFKPGK	ALRESVNLVND	ATPYFKPGKALRESVNLVND
<i>B. burgdorferi</i> B31 Hbb	YFRPGK	DLKERVWGIKG	HVAYFRPGKDLKERVWGIKG
<i>Treponema denticola</i> ATCC 35405 HU	REKPGK	ELKEALHKIDTQELIES	PGKELKEALHKIDTQELIES

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> UNIVERSIDAD DE SOUTHERN CALIFORNIA
HOSPITAL NATIONWIDE CHILDREN'S, INC.

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA RETIRADA DE BIOPELÍCULAS

<130> 064189-3860

10 <140>
<141>

<150> 61/454.972
<151> 21-03-2011

15 <150> 61/397.891
<151> 16-06-2010

20 <150> 61/347.362
<151> 05-21-2010

<150> 61/318.743
<151> 29-03-2010

25 <160> 340

<170> PatentIn version 3.5

30 <210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
40 <221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar = "Ile"

<220>
45 <221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> /reemplazar = "Gln" o "Glu" o "Ala" o "Val" o "Tyr"

<220>
50 <221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar = "Leu" o "Ile" o "Val" o "Phe"

<220>
55 <221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar = "Ile" o "Arg" o "Val"

<220>
60 <221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar = "Ser"

<220>
65 <221> rasgo_misc
<222> (1)..(5)
<223> /nota = "Los restos dados en la secuencia no tienen ninguna preferencia con respecto a aquellos en las

anotaciones para dichas posiciones"

```

<220>
<221> VARIANTE
5 <222> (8)..(8)
  <223> /reemplazar = "Ser" o "Thr" o "Lys"

<220>
<221> rasgo_misc
10 <222> (8)..(8)
  <223> /nota = "El resto dado en la secuencia no tiene ninguna preferencia con respecto a aquellos en las
    anotaciones para dicha posición"

<400> 1
  Val Lys Lys Ser Gly Phe Gly Asn Phe
15 1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"
25

<400> 2
  Val Lys Lys Ser Gly Phe Gly Asn Phe
  1 5

<210> 3
30 <211> 7
  <212> PRT
  <213> Secuencia Artificial

<220>
35 <221> fuente
  <223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> VARIANTE
40 <222> (1)..(1)
  <223> /reemplazar = "Lys" o " "

<220>
<221> VARIANTE
45 <222> (2)..(2)
  <223> /reemplazar = "Ile" o "Lys" o " "

<220>
<221> VARIANTE
50 <222> (3)..(3)
  <223> /reemplazar = "Val"

<220>
<221> VARIANTE
55 <222> (4)..(4)
  <223> /reemplazar = "Ile"

<220>
<221> VARIANTE
60 <222> (5)..(5)
  <223> /reemplazar = "Gln" o "Ser" o "Gly"

<220>

```

<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar = "Lys" o "Ser"

5 <220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar = "Lys" o "Gln" o "Asp"

10 <220>
<221> rasgo_misc
<222> (1)..(7)
<223> /nota = "Los restos dados en la secuencia no tienen ninguna preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

15 <400> 3
Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5

<210> 4
20 <211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
30 <221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar = "Gln"

<220>
35 <221> rasgo_misc
<222> (8)..(8)
<223> /nota = "El resto dado en la secuencia no tiene ninguna preferencia con respecto a aquel en la anotación para dicha posición"

<400> 4
Asn Pro Lys Thr Gly
1 5

40 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
50 <221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
55 <221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar = "Gln"

<220>
60 <221> rasgo_misc
<222> (8)..(8)
<223> /nota = "El resto dado en la secuencia no tiene ninguna preferencia con respecto a aquel en la anotación para dicha posición"

<400> 5

Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5

<210> 6

<211> 96

5 <212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 6

Met Ala Thr Ile Thr Lys Leu Asp Ile Ile Glu Tyr Leu Ser Asp Lys
1 5 10 15

Tyr His Leu Ser Lys Gln Asp Thr Lys Asn Val Val Glu Asn Phe Leu
20 25 30

Glu Glu Ile Arg Leu Ser Leu Glu Ser Gly Gln Asp Val Lys Leu Ser
35 40 45

Gly Phe Gly Asn Phe Glu Leu Arg Asp Lys Ser Ser Arg Pro Gly Arg
50 55 60

Asn Pro Lys Thr Gly Asp Val Val Pro Val Ser Ala Arg Arg Val Val
65 70 75 80

Thr Phe Lys Pro Gly Gln Lys Leu Arg Ala Arg Val Glu Lys Thr Lys
85 90 95

10

<210> 7

<211> 136

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

15

<400> 7

Met Arg Phe Val Thr Ile Phe Ile Asn His Ala Phe Asn Ser Ser Gln
1 5 10 15

Val Arg Leu Ser Phe Ala Gln Phe Leu Arg Gln Ile Arg Lys Asp Thr
20 25 30

Phe Lys Glu Ser Asn Phe Leu Phe Asn Arg Arg Tyr Lys Phe Met Asn
35 40 45

Lys Thr Asp Leu Ile Asp Ala Ile Ala Asn Ala Ala Glu Leu Asn Lys
50 55 60

Lys Gln Ala Lys Ala Ala Leu Glu Ala Thr Leu Asp Ala Ile Thr Ala
65 70 75 80

Ser Leu Lys Glu Gly Glu Pro Val Gln Leu Ile Gly Phe Gly Thr Phe
85 90 95

Lys Val Asn Glu Arg Ala Ala Arg Thr Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly
100 105 110

Ala Glu Ile Gln Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Val Ser Gly
115 120 125

Lys Ala Leu Lys Asp Ala Ile Lys
130 135

<210> 8

<211> 96

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 8

Met Ala Thr Ile Thr Lys Leu Asp Ile Ile Glu Tyr Leu Ser Asp Lys
1 5 10 15

Tyr His Leu Ser Lys Gln Asp Thr Lys Asn Val Val Glu Asn Phe Leu
20 25 30

Glu Glu Ile Arg Leu Ser Leu Glu Ser Gly Gln Asp Val Lys Leu Ser
35 40 45

Gly Phe Gly Asn Phe Glu Leu Arg Asp Lys Ser Ser Arg Pro Gly Arg
50 55 60

Asn Pro Lys Thr Gly Asp Val Val Pro Val Ser Ala Arg Arg Val Val
65 70 75 80

Thr Phe Lys Pro Gly Gln Lys Leu Arg Ala Arg Val Glu Lys Thr Lys
85 90 95

<210> 9

<211> 96
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

5

<400> 9
 Met Ala Thr Ile Thr Lys Leu Asp Ile Ile Glu Tyr Leu Ser Asp Lys
 1 5 10 15
 Tyr His Leu Ser Lys Gln Asp Thr Lys Asn Val Val Glu Asn Phe Leu
 20 25 30
 Glu Glu Ile Arg Leu Ser Leu Glu Ser Gly Gln Asp Val Lys Leu Ser
 35 40 45
 Gly Phe Gly Asn Phe Glu Leu Arg Asp Lys Ser Ser Arg Pro Gly Arg
 50 55 60
 Asn Pro Lys Thr Gly Asp Val Val Pro Val Ser Ala Arg Arg Val Val
 65 70 75 80
 Thr Phe Lys Pro Gly Gln Lys Leu Arg Ala Arg Val Glu Lys Thr Lys
 85 90 95

<210> 10
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

10

<400> 10
 Met Ala Leu Thr Lys Ala Glu Met Ser Glu Tyr Leu Phe Asp Lys Leu
 1 5 10 15
 Gly Leu Ser Lys Arg Asp Ala Lys Glu Leu Val Glu Leu Phe Phe Glu
 20 25 30
 Glu Ile Arg Arg Ala Leu Glu Asn Gly Glu Gln Val Lys Leu Ser Gly
 35 40 45
 Phe Gly Asn Phe Asp Leu Arg Asp Lys Asn Gln Arg Pro Gly Arg Asn
 50 55 60
 Pro Lys Thr Gly Glu Asp Ile Pro Ile Thr Ala Arg Arg Val Val Thr
 65 70 75 80
 Phe Arg Pro Gly Gln Lys Leu Lys Ser Arg Val Glu Asn Ala Ser Pro
 85 90 95

Lys Asp Glu

15

<210> 11

<211> 100
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

5 <400> 11
Met Gly Ala Leu Thr Lys Ala Glu Ile Ala Glu Arg Leu Tyr Glu Glu
 1 5 10 15
Leu Gly Leu Asn Lys Arg Glu Ala Lys Glu Leu Val Glu Leu Phe Phe
 20 25 30
Glu Glu Ile Arg Gln Ala Leu Glu His Asn Glu Gln Val Lys Leu Ser
 35 40 45
Gly Phe Gly Asn Phe Asp Leu Arg Asp Lys Arg Gln Arg Pro Gly Arg
 50 55 60
Asn Pro Lys Thr Gly Glu Glu Ile Pro Ile Thr Ala Arg Arg Val Val
 65 70 75 80
Thr Phe Arg Pro Gly Gln Lys Leu Lys Ala Arg Val Glu Ala Tyr Ala
 85 90 95
Gly Thr Lys Ser
 100

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

10 <400> 12
Thr Phe Arg Pro Gly Gln
 1 5

15 <210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

20 <400> 13
Lys Leu Lys Ser Arg Val Glu Asn Ala Ser Pro Lys Asp Glu
 1 5 10

25 <210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

30 <400> 14
His Phe Lys Pro Gly Lys
 1 5

<210> 15
 <211> 10

<212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5 <400> 15
Glu Leu Arg Asp Arg Ala Asn Ile Tyr Gly
1 5 10

<210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 10 <213> *Haemophilus influenzae*

<400> 16
Thr Phe Lys Pro Gly Gln
1 5

15 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

20 <400> 17
Lys Leu Arg Ala Arg Val Glu Lys Thr Lys
1 5 10

<210> 18
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

<400> 18
Thr Phe Lys Pro Gly Gln
1 5

30 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

35 <400> 19
Lys Leu Arg Ala Arg Val Glu Asn Thr Lys
1 5 10

<210> 20
 <211> 6
 40 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

<400> 20
Thr Phe Lys Pro Gly Gln
1 5

45 <210> 21
 <211> 10

50 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

<400> 21
Lys Leu Arg Ala Arg Val Glu Lys Thr Lys
1 5 10

5 <210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

 <400> 22
Thr Phe Lys Pro Gly Gln
1 5

10 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

15 <400> 23
Lys Leu Arg Ala Arg Val Glu Lys Thr Lys
1 5 10

20 <210> 24
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

 <400> 24
Thr Phe Arg Pro Gly Gln
1 5

25 <210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

30 <400> 25
Lys Leu Lys Ser Arg Val Glu Asn Ala Ser Pro Lys Asp Glu
1 5 10

35 <210> 26
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

 <400> 26
Thr Phe Arg Pro Gly Gln
1 5

40 <210> 27
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

45 <400> 27
Lys Leu Lys Ala Arg Val Glu Ala Tyr Ala Gly Thr Lys Ser
1 5 10

50 <210> 28
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

55 <400> 28

Met Asn Lys Thr Gln Leu Ile Asp Val Ile Ala Glu Lys Ala Glu Leu
1 5 10 15

Ser Lys Thr Gln Ala Lys Ala Ala Leu Glu Ser Thr Leu Ala Ala Ile
20 25 30

Thr Glu Ser Leu Lys Glu Gly Asp Ala Val Gln Leu Val Gly Phe Gly
35 40 45

Thr Phe Lys Val Asn His Arg Ala Glu Arg Thr Gly Arg Asn Pro Gln
50 55 60

Thr Gly Lys Glu Ile Lys Ile Ala Ala Ala Asn Val Pro Ala Phe Val
65 70 75 80

Ser Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
85 90

<210> 29

<211> 90

5 <212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 29

Met Asn Lys Ser Gln Leu Ile Asp Lys Ile Ala Ala Gly Ala Asp Ile
1 5 10 15

Ser Lys Ala Ala Ala Gly Arg Ala Leu Asp Ala Ile Ile Ala Ser Val
20 25 30

Thr Glu Ser Leu Lys Glu Gly Asp Asp Val Ala Leu Val Gly Phe Gly
35 40 45

Thr Phe Ala Val Lys Glu Arg Ala Ala Arg Thr Gly Arg Asn Pro Gln
50 55 60

Thr Gly Lys Glu Ile Thr Ile Ala Ala Ala Lys Val Pro Ser Phe Arg
65 70 75 80

Ala Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Asn
85 90

10

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

15

<400> 30

Ala Phe Val Ser Gly Lys
1 5

<210> 31

<211> 7
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5 <400> 31
Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
1 5

10 <210> 32
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

15 <400> 32
Ser Phe Arg Ala Gly Lys
1 5

20 <210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

25 <400> 33
Ala Leu Lys Asp Ala Val Asn
1 5

30 <210> 34
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

35 <400> 34
Thr Phe Arg Pro Gly Gln Lys Leu Lys Ser Arg Val Glu Asn Ala Ser
1 5 10 15

40 **Pro Lys Asp Glu**
20

45 <210> 35
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

50 <400> 35
Lys Tyr Val Pro His Phe Lys Pro Gly Lys Glu Leu Arg Asp Arg Ala
1 5 10 15

55 **Asn Ile Tyr Gly**
20

60 <210> 36
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de consenso sintética"

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(10)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra
 5
 <400> 36
watcaannnn ttr
 <210> 37
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 15
 <400> 37
Gly Pro Ser Leu Lys Leu
1 5
 20
 <210> 38
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 30
 <400> 38
Gly Pro Ser Leu
1
 <210> 39
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 40
 <400> 39
Pro Ser Leu Lys
1
 45
 <210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 55
 <400> 40
Gly Pro Ser Leu Lys
1 5
 <210> 41
 <211> 4
 <212> PRT
 60

13

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota = "Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 41

Ser Leu Lys Leu
1

10 <210> 42

<211> 99

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

15 <400> 42

Met Ala Leu Thr Lys Ala Glu Met Ser Glu Tyr Leu Phe Asp Lys Leu
1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Arg Asp Ala Lys Glu Leu Val Glu Leu Phe Phe Glu
20 25 30

Glu Ile Arg Arg Ala Leu Glu Asn Gly Glu Gln Val Lys Leu Ser Gly
35 40 45

Phe Gly Asn Phe Asp Leu Arg Asp Lys Asn Gln Arg Pro Gly Arg Asn
50 55 60

Pro Lys Thr Gly Glu Asp Ile Pro Ile Thr Ala Arg Arg Val Val Thr
65 70 75 80

Phe Arg Pro Gly Gln Lys Leu Lys Ser Arg Val Glu Asn Ala Ser Pro
85 90 95

Lys Asp Glu

20 <210> 43

<211> 99

<212> PRT

<213> *Salmonella enterica*

25 <400> 43

Met Ala Leu Thr Lys Ala Glu Met Ser Glu Tyr Leu Phe Asp Lys Leu
1 5 10 15

Gly Leu Ser Lys Arg Asp Ala Lys Glu Leu Val Glu Leu Phe Phe Glu
20 25 30

Glu Ile Arg Arg Ala Leu Glu Asn Gly Glu Gln Val Lys Leu Ser Gly
35 40 45

Phe Gly Asn Phe Asp Leu Arg Asp Lys Asn Gln Arg Pro Gly Arg Asn
50 55 60

Pro Lys Thr Gly Glu Asp Ile Pro Ile Thr Ala Arg Arg Val Val Thr
65 70 75 80

Phe Arg Pro Gly Gln Lys Leu Lys Ser Arg Val Glu Asn Ala Ser Pro
85 90 95

Lys Glu Glu

<210> 44

<211> 98

<212> PRT

<213> *Vibrio cholerae*

<400> 44

Met Ala Leu Thr Lys Ala Glu Leu Ala Glu Ala Leu Phe Glu Gln Leu
1 5 10 15

Gly Met Ser Lys Arg Asp Ala Lys Asp Thr Val Glu Val Phe Phe Glu
20 25 30

Glu Ile Arg Lys Ala Leu Glu Ser Gly Glu Gln Val Lys Leu Ser Gly
35 40 45

Phe Gly Asn Phe Asp Leu Arg Asp Lys Asn Glu Arg Pro Gly Arg Asn

50

55

60

Pro Lys Thr Gly Glu Asp Ile Pro Ile Thr Ala Arg Arg Val Val Thr
65 70 75 80

Phe Arg Pro Gly Gln Lys Leu Lys Ala Arg Val Glu Asn Ile Lys Val
85 90 95

Glu Lys

<210> 45

ES 2 754 240 T3

<211> 100
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

5 <400> 45
Met Gly Ala Leu Thr Lys Ala Glu Ile Ala Glu Arg Leu Tyr Glu Glu
1 5 10 15

Leu Gly Leu Asn Lys Arg Glu Ala Lys Glu Leu Val Glu Leu Phe Phe
20 25 30

Glu Glu Ile Arg Gln Ala Leu Glu His Asn Glu Gln Val Lys Leu Ser
35 40 45

Gly Phe Gly Asn Phe Asp Leu Arg Asp Lys Arg Gln Arg Pro Gly Arg
50 55 60

Asn Pro Lys Thr Gly Glu Glu Ile Pro Ile Thr Ala Arg Arg Val Val
65 70 75 80

Thr Phe Arg Pro Gly Gln Lys Leu Lys Ala Arg Val Glu Ala Tyr Ala
85 90 95

Gly Thr Lys Ser
100

<210> 46
<211> 96
<212> PRT
<213> *Haemophilus influenzae*

10 <400> 46
Met Ala Thr Ile Thr Lys Leu Asp Ile Ile Glu Tyr Leu Ser Asp Lys
1 5 10 15

Tyr His Leu Ser Lys Gln Asp Thr Lys Asn Val Val Glu Asn Phe Leu
20 25 30

15 Glu Glu Ile Arg Leu Ser Leu Glu Ser Gly Gln Asp Val Lys Leu Ser
35 40 45

Gly Phe Gly Asn Phe Glu Leu Arg Asp Lys Ser Ser Arg Pro Gly Arg
50 55 60

Asn Pro Lys Thr Gly Asp Val Val Pro Val Ser Ala Arg Arg Val Val
65 70 75 80

Thr Phe Lys Pro Gly Gln Lys Leu Arg Ala Arg Val Glu Lys Thr Lys
85 90 95

<210> 47

<211> 98
 <212> PRT
 <213> *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

5 <400> 47
Met Thr Leu Thr Lys Val Glu Leu Ala Glu Asn Leu Ile Glu Lys Phe
1 5 10 15

His Leu Ser Lys Arg Glu Ala Lys Asp Leu Val Glu Ser Phe Phe Glu
20 25 30

Glu Ile Arg Val Ala Leu Glu Thr Gly Asn Asp Val Lys Leu Ser Gly
35 40 45

Phe Gly Asn Phe Glu Leu Arg Asp Lys Ala Ser Arg Pro Gly Arg Asn
50 55 60

Pro Lys Thr Gly Glu Ser Val Pro Val Ser Ala Arg Arg Val Val Val
65 70 75 80

Phe Lys Pro Gly Gln Lys Leu Arg Asn Arg Val Glu Lys Val Lys Pro
85 90 95

Lys Ala

<210> 48
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Moraxella catarrhalis*

10 <400> 48
Met Gly Ala Leu Thr Lys Ala Asp Met Val Asp Glu Leu Thr Ile Arg
1 5 10 15

Leu Arg Leu Thr Arg Gln Gln Ala Arg Lys Leu Val Asp Gly Phe Phe
20 25 30

15

Glu Glu Ile Ser Gln Ser Leu Ala Gln Gly His Glu Val Lys Leu Ser
35 40 45

Gly Phe Gly Asn Phe Glu Leu Lys Asp Lys Lys Pro Arg Pro Gly Arg
50 55 60

Asn Pro Lys Thr Gly Glu Ser Val Pro Ile Gln Ala Arg Arg Val Val
65 70 75 80

Thr Phe Lys Ala Gly Gln Lys Leu Arg Gly Trp Ile Asp Ser Gln Asn
85 90 95

Glu Gly

<210> 49

<211> 100

<212> PRT

<213> *Neisseria gonorrhoeae*

<400> 49

Met Thr Leu Thr Lys Ala Glu Leu Ala Asp Ile Leu Val Asp Lys Val
1 5 10 15

Ser Asn Val Thr Lys Asn Asp Ala Lys Glu Ile Val Glu Leu Phe Phe
20 25 30

Glu Glu Ile Arg Ser Thr Leu Ala Ser Gly Glu Glu Ile Lys Ile Ser
35 40 45

Gly Phe Gly Asn Phe Gln Leu Arg Asp Lys Pro Gln Arg Pro Gly Arg
50 55 60

Asn Pro Lys Thr Gly Glu Glu Val Pro Ile Thr Ala Arg Arg Val Val
65 70 75 80

Thr Phe His Ala Ser Gln Lys Leu Lys Gly Met Val Glu His Tyr Tyr
85 90 95

Asp Lys Gln Arg
100

<210> 50

<211> 100

<212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 50

Met Thr Leu Thr Lys Ala Glu Leu Ala Asp Ile Leu Val Asp Lys Val
1 5 10 15

ES 2 754 240 T3

Ser Asn Val Thr Lys Asn Asp Ala Lys Glu Ile Val Glu Leu Phe Phe
20 25 30

Glu Glu Ile Arg Ser Thr Leu Ala Ser Gly Glu Glu Ile Lys Ile Ser
35 40 45

Gly Phe Gly Asn Phe Gln Leu Arg Asp Lys Pro Gln Arg Pro Gly Arg
50 55 60

Asn Pro Lys Thr Gly Glu Glu Val Pro Ile Thr Ala Arg Arg Val Val
65 70 75 80

Thr Phe His Ala Ser Gln Lys Leu Lys Ser Met Val Glu His Tyr Tyr
85 90 95

Asp Lys Gln Arg
100

<210> 51
<211> 101
<212> PRT
<213> *Burkholderia cenocepacia*

<400> 51
Ala Ser Thr Glu Thr Pro Thr Leu Thr Lys Ala Glu Leu Ala Glu Leu
1 5 10 15

Leu Phe Asp Ser Val Gly Leu Asn Lys Arg Glu Ala Lys Asp Met Val
20 25 30

Glu Ala Phe Phe Glu Val Ile Arg Asp Ala Leu Glu Asn Gly Glu Ser
35 40 45

Val Lys Leu Ser Gly Phe Gly Asn Phe Gln Leu Arg Asp Lys Pro Gln
50 55 60

Arg Pro Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly Glu Ala Ile Pro Ile Ala Ala
65 70 75 80

Arg Arg Val Val Thr Phe His Ala Ser Gln Lys Leu Lys Ala Leu Val
85 90 95

Glu Asn Gly Ala Glu
100

<210> 52
<211> 107
<212> PRT
<213> *Burkholderia pseudomallei*

<400> 52

Thr Ser Ala Gly Asp Thr Pro Thr Leu Thr Lys Ala Glu Leu Ala Glu
1 5 10 15

Leu Leu Phe Asp Ser Val Gly Leu Asn Lys Arg Glu Ala Lys Asp Met
20 25 30

Val Glu Ala Phe Phe Glu Val Ile Arg Asp Ala Leu Glu Asn Gly Glu
35 40 45

Ser Val Lys Leu Ser Gly Phe Gly Asn Phe Gln Leu Arg Asp Lys Pro
50 55 60

Gln Arg Pro Gly Arg Asn Pro Asn Thr Gly Glu Ala Ile Pro Ile Ala
65 70 75 80

Ala Arg Arg Val Val Thr Phe His Ala Ser Gln Lys Leu Lys Ala Leu
85 90 95

Val Glu Asn Gly Ala Glu Pro Asp Leu Ala Arg
100 105

5 <210> 53
<211> 113
<212> PRT
<213> *Bordetella pertussis*

10 <400> 53

Met Gly Thr Thr Met Leu Ala Glu Pro Arg Thr Leu Thr Lys Ala Glu
1 5 10 15

Leu Ala Glu Leu Leu Phe Glu Arg Val Gly Leu Asn Lys Arg Glu Ala
20 25 30

Lys Asp Ile Val Asp Thr Phe Phe Glu Glu Ile Arg Asp Ala Leu Ala
35 40 45

Arg Gly Asp Ser Val Lys Leu Ser Gly Phe Gly Asn Phe Gln Val Arg
50 55 60

Asp Lys Pro Pro Arg Pro Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly Glu Thr Ile
65 70 75 80

Pro Ile Ala Ala Arg Arg Val Val Thr Phe His Ala Ser Gln Lys Leu
85 90 95

Lys Ser Val Val Glu Gln Pro Asn Ser Pro Pro Asp Pro Ala Ser Ala
100 105 110

Glu

5 <210> 54
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> *Prevotella melaninogenica*

<400> 54

Met Asn Asn Lys Glu Phe Ile Ala Ala Leu Ala Ala Arg Thr Gly Tyr
 1 5 10 15

Thr Gln Asp Glu Ser Gln Lys Met Val Lys Thr Val Val Asp Met Met
 20 25 30

Gly Lys Ser Phe Glu Thr Gly Asp Pro Val Pro Val Ile Gly Phe Gly
 35 40 45

Thr Phe Glu Val Lys Lys Arg Leu Glu Arg Val Met Val Asn Pro Ser
 50 55 60

Thr Gly Leu Arg Met Leu Val Pro Pro Lys Leu Val Leu Asn Phe Lys
 65 70 75 80

Pro Ala Ala Thr Ile Lys Gly His Val Arg Lys Gly Gly Gln Asp Asn
 85 90 95

Gly

10
 15 <210> 55
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Prevotella intermedia*

<400> 55

Met Asn Asn Lys Glu Phe Ile Thr Ala Leu Ala Asn Arg Val Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Gln Asp Glu Thr Gln Lys Leu Val Lys Thr Ala Leu Gln Ala Met
 20 25 30

Gly Asp Asn Phe Glu Ser Gly Glu Pro Val Leu Val Ser Gly Phe Gly
 35 40 45

Ser Phe Glu Val Lys Lys Arg Leu Glu Arg Ile Met Thr Asn Pro Ala
 50 55 60

Thr Gly Leu Arg Met Leu Val Pro Pro Lys Leu Val Leu Asn Phe Arg

ES 2 754 240 T3

65 70 75 80

Ala Thr Ala Ser Val Lys Glu Lys Leu Lys Lys Gly Gly Ala Glu
85 90 95

<210> 56
<211> 105
<212> PRT
<213> *Treponema palladium*

<400> 56
Met Lys Arg Val Arg Arg Thr Arg Ser Phe Val Val Asp Ala Leu Cys
1 5 10 15

Asp Glu Val Asp Leu Ser Arg Arg His Val Ala Arg Val Val Asp Ser
20 25 30

Phe Val Ser Val Val Thr Ala Ala Leu Glu Arg Gly Glu Thr Val Glu
35 40 45

Leu Arg Asp Phe Gly Val Phe Glu Ser Arg Val Arg Lys Ala Ser Val
50 55 60

Gly Lys Ser Ile Asn Thr Gly Glu Val Val Ser Ile Pro Ser His Cys
65 70 75 80

Val Val Val Phe Arg Pro Ser Lys Arg Leu Lys Ser Ala Val Arg Gly
85 90 95

Tyr Arg Ser Gly Glu Val Gly Ala Asp
100 105

<210> 57
<211> 101
<212> PRT
<213> *Prevotella melaninogenica*

<400> 57
Met Ala Lys Ser Ala Ile Gln Leu Ile Thr Ser Ala Leu Ala Lys Gln
1 5 10 15

His Asn Leu Ser Ala Asp Asp Ala Ala Ala Phe Val Asp Ala Phe Phe
20 25 30

Asp Ile Ile Ser Ser Glu Leu Lys Asn Gly Asn Gln Val Lys Ile Lys
35 40 45

Gly Leu Gly Thr Phe Lys Val Gln Ala Val Lys Pro Arg Glu Ser Val
50 55 60

Asn Val Asn Thr Gly Glu Arg Val Leu Ile Glu Gly His Asp Lys Ile
65 70 75 80

Ser Phe Thr Pro Asp Thr Val Met Lys Glu Leu Val Asn Lys Pro Phe
85 90 95

Ser Gln Phe Glu Thr
100

<210> 58

<211> 101

5 <212> PRT

<213> *Prevotella intermedia*

<400> 58

Met Ala Lys Thr Ala Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ala Val Ala Lys Lys
1 5 10 15

His Lys Ile Thr Val Lys Glu Ala Glu Lys Phe Val Ser Ala Ile Phe
20 25 30

Asp Val Val Asn Glu Gly Leu Lys Thr Asp Lys Leu Val Lys Val Lys
35 40 45

Gly Leu Gly Thr Phe Lys Val Gln Ala Val Lys Pro Arg Glu Ser Val
50 55 60

Asn Val Asn Thr Gly Glu Arg Val Leu Ile Glu Gly His Glu Lys Val
65 70 75 80

Ser Phe Thr Pro Asp Ala Thr Met Lys Glu Leu Val Asn Lys Pro Phe
85 90 95

Ala Gln Phe Glu Thr
100

10

<210> 59

<211> 90

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

15

<400> 59

Met Asn Lys Thr Asp Leu Ile Asn Ala Val Ala Glu Gln Ala Asp Leu
1 5 10 15

Thr Lys Lys Glu Ala Gly Ser Ala Val Asp Ala Val Phe Glu Ser Ile
20 25 30

Gln Asn Ser Leu Ala Lys Gly Glu Lys Val Gln Leu Ile Gly Phe Gly
35 40 45

Asn Phe Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro Gln
50 55 60

Thr Gly Lys Glu Ile Asp Ile Pro Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Lys
65 70 75 80

Ala Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
85 90

<210> 60

<211> 90

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 60

Met Asn Lys Thr Gln Leu Ile Asp Val Ile Ala Glu Lys Ala Glu Leu
1 5 10 15

Ser Lys Thr Gln Ala Lys Ala Ala Leu Glu Ser Thr Leu Ala Ala Ile
20 25 30

Thr Glu Ser Leu Lys Glu Gly Asp Ala Val Gln Leu Val Gly Phe Gly
35 40 45

Thr Phe Lys Val Asn His Arg Ala Glu Arg Thr Gly Arg Asn Pro Gln
50 55 60

Thr Gly Lys Glu Ile Lys Ile Ala Ala Ala Asn Val Pro Ala Phe Val
65 70 75 80

Ser Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
85 90

<210> 61

<211> 90

<212> PRT

<213> *Staphylococcus epidermidis*

<400> 61

Met Asn Lys Thr Asp Leu Ile Asn Ala Val Ala Glu Gln Ala Asp Leu
1 5 10 15

Thr Lys Lys Glu Ala Gly Ser Ala Val Asp Ala Val Phe Glu Ser Ile
20 25 30

Gln Asn Ser Leu Ala Lys Gly Glu Lys Val Gln Leu Ile Gly Phe Gly
35 40 45

Asn Phe Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro Gln
50 55 60

Thr Gly Lys Glu Ile Asp Ile Pro Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Lys
65 70 75 80

Ala Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
85 90

5 <210> 62
<211> 91
<212> PRT
<213> *Streptococcus sobrinus*

<400> 62
Met Ala Asn Lys Gln Asp Leu Ile Ala Lys Val Ala Glu Ala Thr Glu
1 5 10 15

Leu Thr Lys Lys Asp Ser Ala Ala Ala Val Asp Thr Val Phe Ser Ser
20 25 30

Ile Glu Gly Phe Leu Ser Lys Gly Glu Lys Val Gln Leu Ile Gly Phe
35 40 45

Gly Asn Phe Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro
50 55 60

Gln Thr Gly Ala Glu Ile Lys Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe
65 70 75 80

10 Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
85 90

15 <210> 63
<211> 91
<212> PRT
<213> *Streptococcus pyogeneses*

<400> 63
Met Ala Asn Lys Gln Asp Leu Ile Ala Lys Val Ala Glu Ala Thr Glu
1 5 10 15

Leu Thr Lys Lys Asp Ser Ala Ala Ala Val Asp Ala Val Phe Ser Thr
20 25 30

Ile Glu Ala Phe Leu Ala Glu Gly Glu Lys Val Gln Leu Ile Gly Phe
35 40 45

Gly Asn Phe Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro
50 55 60

Gln Thr Gly Ala Glu Ile Glu Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe

65 70 75 80

Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
85 90

<210> 64
<211> 91
<212> PRT
<213> *Streptococcus gallolyticus*

<400> 64
Met Ala Asn Lys Gln Asp Leu Ile Ala Lys Val Ala Glu Ala Thr Glu
1 5 10 15

Leu Thr Lys Lys Asp Ser Ala Ala Ala Val Asp Ala Val Phe Ser Ala
20 25 30

Ile Glu Ser Phe Leu Ser Glu Gly Glu Lys Val Gln Leu Ile Gly Phe
35 40 45

Gly Asn Phe Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro
50 55 60

Gln Thr Gly Glu Glu Ile Glu Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe
65 70 75 80

Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
85 90

<210> 65
<211> 91
<212> PRT
<213> *Streptococcus agalactiae*

<400> 65
Met Ala Asn Lys Gln Asp Leu Ile Ala Lys Val Ala Glu Ala Thr Glu
1 5 10 15

Leu Thr Lys Lys Asp Ser Ala Ala Ala Val Asp Ala Val Phe Ala Ala
20 25 30

Val Ala Asp Tyr Leu Ala Glu Gly Glu Lys Val Gln Leu Ile Gly Phe
35 40 45

Gly Asn Phe Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro
50 55 60

Gln Thr Gly Ala Glu Ile Glu Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe
65 70 75 80

Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
85 90

<210> 66

<211> 91

5 <212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 66

Met Ala Asn Lys Gln Asp Leu Ile Ala Lys Val Ala Glu Ala Thr Glu
1 5 10 15

Leu Thr Lys Lys Asp Ser Ala Ala Ala Val Glu Ala Val Phe Ala Ala
20 25 30

Val Ala Asp Tyr Leu Ala Ala Gly Glu Lys Val Gln Leu Ile Gly Phe
35 40 45

Gly Asn Phe Glu Val Arg Glu Arg Ala Glu Arg Lys Gly Arg Asn Pro
50 55 60

Gln Thr Gly Lys Glu Met Thr Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe
65 70 75 80

Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
85 90

10

<210> 67

<211> 91

<212> PRT

<213> *Streptococcus gordonii*

15

<400> 67

Met Ala Asn Lys Gln Asp Leu Ile Ala Lys Val Ala Ala Ala Thr Glu
1 5 10 15

Leu Thr Lys Lys Asp Ser Ala Ala Ala Val Asp Ala Val Phe Ala Ala
20 25 30

Val Thr Glu Tyr Leu Ser Lys Gly Glu Lys Val Gln Leu Ile Gly Phe
35 40 45

Gly Asn Phe Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro
50 55 60

Gln Thr Gly Lys Glu Ile Lys Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe
65 70 75 80

Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
85 90

ES 2 754 240 T3

<210> 68
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus mutans*

5

<400> 68
 Met Ala Asn Lys Gln Asp Leu Ile Ala Lys Val Ala Glu Ala Thr Glu
 1 5 10 15
 Leu Thr Lys Lys Asp Ser Ala Ala Ala Val Asp Ala Val Phe Ser Ala
 20 25 30
 Val Ser Ser Tyr Leu Ala Lys Gly Glu Lys Val Gln Leu Ile Gly Phe
 35 40 45
 Gly Asn Phe Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro
 50 55 60
 Gln Thr Gly Glu Glu Ile Lys Ile Lys Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe
 65 70 75 80
 Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
 85 90

<210> 69
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> *Enterococcus faecalis*

10

<400> 69
 Met Ala Asn Lys Ala Glu Leu Ile Glu Asn Val Ala Ser Ser Thr Gly
 1 5 10 15
 Leu Thr Lys Lys Asp Ala Thr Ala Ala Val Asp Ala Val Phe Ser Thr
 20 25 30
 Ile Gln Glu Thr Leu Ala Lys Gly Glu Lys Val Gln Leu Ile Gly Phe
 35 40 45
 Gly Asn Phe Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro
 50 55 60
 Gln Thr Gly Gln Glu Ile Gln Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe
 65 70 75 80
 Lys Pro Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
 85 90

15

<210> 70
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

20

<400> 70

```

Met Asn Lys Thr Asp Leu Ile Asp Ala Ile Ala Asn Ala Ala Glu Leu
 1          5          10          15

Asn Lys Lys Gln Ala Lys Ala Ala Leu Glu Ala Thr Leu Asp Ala Ile
 20          25          30

Thr Ala Ser Leu Lys Glu Gly Glu Pro Val Gln Leu Ile Gly Phe Gly
 35          40          45

Thr Phe Lys Val Asn Glu Arg Ala Ala Arg Thr Gly Arg Asn Pro Gln
 50          55          60

Thr Gly Ala Glu Ile Gln Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Val
 65          70          75          80

Ser Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Ile Lys
 85          90

```

5 <210> 71
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> *Vibrio cholerae*

```

10 <400> 71
Met Asn Lys Thr Gln Leu Ile Asp Phe Ile Ala Glu Lys Ala Asp Leu
 1          5          10          15

Thr Lys Val Gln Ala Lys Ala Ala Leu Glu Ala Thr Leu Gly Ala Val
 20          25          30

Glu Gly Ala Leu Lys Asp Gly Asp Gln Val Gln Leu Ile Gly Phe Gly
 35          40          45

Thr Phe Lys Val Asn His Arg Ser Ala Arg Thr Gly Arg Asn Pro Gln
 50          55          60

Thr Gly Glu Glu Ile Lys Ile Ala Ala Ala Asn Val Pro Ala Phe Val
 65          70          75          80

Ala Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Ile Lys
 85          90

```

15 <210> 72
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 72

Met Asn Lys Ser Glu Leu Ile Asp Ala Ile Ala Ala Ser Ala Asp Ile
1 5 10 15

Pro Lys Ala Val Ala Gly Arg Ala Leu Asp Ala Val Ile Glu Ser Val
20 25 30

Thr Gly Ala Leu Lys Ala Gly Asp Ser Val Val Leu Val Gly Phe Gly
35 40 45

Thr Phe Ala Val Lys Glu Arg Ala Ala Arg Thr Gly Arg Asn Pro Gln
50 55 60

Thr Gly Lys Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ala Lys Ile Pro Gly Phe Lys
65 70 75 80

Ala Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Asn
85 90

<210> 73

<211> 90

5 <212> PRT

<213> *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

<400> 73

Met Asn Lys Thr Asp Leu Ile Asp Ala Ile Ala Ser Ser Ala Glu Leu
1 5 10 15

Asn Lys Lys Gln Ala Lys Ala Ala Leu Glu Ala Thr Leu Asp Ala Ile
20 25 30

Thr Gly Ser Leu Lys Lys Gly Glu Ala Val Gln Leu Ile Gly Phe Gly
35 40 45

Thr Phe Lys Val Asn Ala Arg Lys Ala Arg Thr Gly Arg Asn Pro Gln
50 55 60

Thr Gly Ala Glu Ile Lys Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Val
65 70 75 80

Ser Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
85 90

10

<210> 74

<211> 90

<212> PRT

<213> *Vibrio cholerae*

15

<400> 74

Met Asn Lys Thr Gln Leu Val Glu Gln Ile Ala Ala Asn Ala Asp Ile
1 5 10 15

Ser Lys Ala Ser Ala Gly Arg Ala Leu Asp Ala Phe Ile Glu Ala Val
20 25 30

Ser Gly Thr Leu Gln Ser Gly Asp Gln Val Ala Leu Val Gly Phe Gly
35 40 45

Thr Phe Ser Val Arg Thr Arg Ala Ala Arg Thr Gly Arg Asn Pro Lys
50 55 60

Thr Gly Glu Glu Ile Lys Ile Ala Glu Ala Lys Val Pro Ser Phe Lys
65 70 75 80

Ala Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Cys Asn
85 90

<210> 75

<211> 90

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 75

Met Asn Lys Ser Gln Leu Ile Asp Lys Ile Ala Ala Gly Ala Asp Ile
1 5 10 15

Ser Lys Ala Ala Ala Gly Arg Ala Leu Asp Ala Ile Ile Ala Ser Val
20 25 30

Thr Glu Ser Leu Lys Glu Gly Asp Asp Val Ala Leu Val Gly Phe Gly
35 40 45

Thr Phe Ala Val Lys Glu Arg Ala Ala Arg Thr Gly Arg Asn Pro Gln
50 55 60

Thr Gly Lys Glu Ile Thr Ile Ala Ala Ala Lys Val Pro Ser Phe Arg
65 70 75 80

Ala Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Asn
85 90

<210> 76

<211> 90

<212> PRT

<213> *Moraxella catarrhalis*

<400> 76

Met Asn Lys Ser Glu Leu Val Asp Ser Ile Ala Gln Ser Ala Gly Leu
1 5 10 15

Thr Lys Glu Gln Ala Ala Lys Ala Val Asn Ala Phe Thr Glu Ser Val

ES 2 754 240 T3

20

25

30

Gln Gly Ala Leu Gln Arg Gly Asp Asp Val Val Leu Val Gly Phe Gly
35 40 45

Thr Phe Ser Val Lys Glu Arg Ala Ala Arg Met Gly Arg Asn Pro Lys
50 55 60

Thr Gly Glu Ala Ile Gln Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ser Phe Lys
65 70 75 80

Ala Gly Lys Val Leu Lys Glu Ser Val Asn
85 90

<210> 77

<211> 90

<212> PRT

<213> *Bordetella pertussis*

<400> 77

Met Asn Lys Thr Glu Leu Ile Asp His Ile Ala Ser Lys Ala Asp Ile
1 5 10 15

Ser Lys Ala Ala Ala Gly Arg Ser Leu Asp Ala Leu Ile Gly Ala Val
20 25 30

Lys Thr Thr Leu Lys Lys Gly Gly Thr Val Thr Leu Val Gly Phe Gly
35 40 45

Thr Phe Ala Val Ser Ala Arg Ala Ala Arg Thr Gly Arg Asn Pro Arg
50 55 60

Thr Gly Glu Thr Ile Lys Ile Lys Lys Ala Lys Val Pro Lys Phe Arg
65 70 75 80

Pro Gly Lys Ala Leu Lys Asp Ala Val Asn
85 90

<210> 78

<211> 99

<212> PRT

<213> *Moraxella catarrhalis*

<400> 78

Met Gln Ala Val Ile Asn Lys Ser Asn Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ser
1 5 10 15

Val Cys Glu Glu Leu Glu Glu Asp Val Val Asp Glu Ala Val Arg Leu
20 25 30

Met Ile Ala Met Met Val Asn Glu Leu Val Tyr Asp Gly Arg Ile Glu
35 40 45

Val Arg Gly Phe Gly Ser Phe Cys Leu His His Arg Ser Ala Arg Ile
50 55 60

Ala Arg Asn Pro Arg Thr Gly Glu Ser Val Ser Val Lys Ala Lys Ala
65 70 75 80

Thr Pro Tyr Phe Lys Pro Gly Lys Ala Leu Arg Glu Ser Val Asn Leu
85 90 95

Val Asn Asp

<210> 79

<211> 91

<212> PRT

<213> *Prevotella melaninogenica*

<400> 79

Met Asn Lys Thr Glu Leu Ile Glu Lys Ile Ala Ala Asn Ala Glu Val
1 5 10 15

Ser Lys Ala Ala Ala Lys Lys Ala Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ala Ile
20 25 30

Lys Glu Ala Leu Ala Ala Gly Asp Lys Val Gln Leu Val Gly Phe Gly
35 40 45

Thr Phe Ala Thr Thr Glu Arg Pro Ala His Glu Gly Ile Asn Pro Arg
50 55 60

Ser Lys Glu Lys Ile Lys Ile Ala Ala Lys Lys Val Ala Lys Phe Lys
65 70 75 80

Ala Gly Ala Glu Leu Ala Asp Ala Val Asn Lys
85 90

<210> 80

<211> 91

<212> PRT

<213> *Prevotella intermedia*

<400> 80

Met Asn Lys Thr Glu Leu Ile Glu Lys Ile Ala Ala Gly Ala Gly Leu
1 5 10 15

Ser Lys Ala Asp Ser Lys Lys Ala Leu Asp Ala Met Thr Ala Ala Ile
20 25 30

Lys Glu Ala Leu Val Ala Gly Asp Lys Val Gln Leu Val Gly Phe Gly
35 40 45

Thr Tyr Ser Val Thr Glu Arg Pro Ala His Glu Gly Ile Asn Pro Ala
50 55 60

Thr Lys Gln Lys Ile Gln Ile Ala Ala Lys Lys Val Ala Lys Phe Lys
65 70 75 80

Pro Gly Ala Glu Leu Ala Asp Ala Val Asn Ala
85 90

<210> 81

<211> 106

<212> PRT

<213> *Treponema denticola*

<400> 81

Met Lys Gln Lys Arg Ser Lys Ile Asp Ile Ile Asp Ser Val Tyr Arg
1 5 10 15

Asn Asn Pro Gln Tyr Gln Leu Lys Gln Ile Asn Ala Ile Ala Asn Leu
20 25 30

Phe Leu Asp Glu Leu Ser Val Leu Leu Gln Gln Gly Ile Pro Val Glu
35 40 45

Ile Arg Gly Leu Gly Ser Phe Asp Phe Ala Val Leu His Gly Arg Lys
50 55 60

Asn Ala Arg Asn Pro Lys Thr Gly Glu Ala Val Leu Thr Ala Asp Arg
65 70 75 80

Cys Lys Val Arg Phe Lys Pro Gly Lys Glu Leu Lys Glu Ala Leu His
85 90 95

Lys Ile Asp Thr Gln Glu Leu Ile Glu Ser
100 105

<210> 82

<211> 88

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 82

Met Asn Lys Thr Asp Phe Ile Ala Ala Val Ala Glu Lys Ala Asn Leu
1 5 10 15

Thr Lys Ala Asp Ala Gln Arg Ala Val Asn Ala Phe Ala Glu Val Val
20 25 30

Thr Glu Gln Met Asn Ala Gly Glu Lys Ile Ala Leu Ile Gly Phe Gly
35 40 45

Thr Phe Ser Val Ser Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Ile Asn Pro Lys
50 55 60

Thr Lys Lys Ser Ile Ser Ile Pro Ala Arg Lys Val Val Arg Phe Lys
65 70 75 80

Pro Gly Ser Thr Leu Glu Leu Lys
85

<210> 83

<211> 94

5 <212> PRT

<213> *Helicobacter pylori*

<400> 83

Met Asn Lys Ala Glu Phe Ile Asp Leu Val Lys Glu Ala Gly Lys Tyr
1 5 10 15

Asn Ser Lys Arg Glu Ala Glu Glu Ala Ile Ser Ala Phe Thr Leu Ala
20 25 30

Val Glu Thr Ala Leu Ser Lys Gly Glu Ser Val Glu Leu Ile Gly Phe
35 40 45

Gly Lys Phe Glu Thr Ala Glu Gln Lys Gly Lys Glu Gly Lys Val Pro
50 55 60

Gly Ser Asp Lys Thr Tyr Lys Thr Glu Asp Lys Arg Val Pro Lys Phe
65 70 75 80

Lys Phe Gly Lys Thr Leu Lys Gln Lys Val Glu Glu Gly Lys
85 90

10

<210> 84

<211> 92

<212> PRT

<213> *Prevotella melaninogenica*

15

<400> 84

Met Thr Lys Ala Asp Ile Ile Asn Glu Ile Ala Thr Ser Thr Gly Ile
1 5 10 15

Ala Lys Lys Asp Val Ser Ala Val Val Glu Ser Phe Met Glu Thr Ile
20 25 30

Lys Asp Ser Leu Leu Glu Lys Lys Glu Asn Val Tyr Leu Arg Gly Phe

35

40

45

Gly Ser Phe Ile Val Lys His Arg Ala Glu Lys Thr Ala Arg Asn Ile
50 55 60

Ser Lys Asn Thr Thr Ile Thr Ile Pro Ala His Asp Phe Pro Ser Phe
65 70 75 80

Lys Pro Ala Lys Thr Phe Ile Glu Asp Met Lys Lys
85 90

<210> 85

<211> 92

<212> PRT

<213> *Prevotella intermedia*

<400> 85

Met Thr Lys Ala Asp Ile Ile Asn Glu Ile Ala Ser Ser Thr Gly Ile
1 5 10 15

Ser Lys Lys Asp Val Ser Ala Val Val Glu Ser Phe Met Asp Ala Ile
20 25 30

Lys Asp Ser Leu Leu Glu Asn Lys Glu Asn Val Tyr Leu Arg Gly Phe
35 40 45

Gly Ser Phe Ile Val Lys His Arg Ala Glu Lys Thr Ala Arg Asn Ile
50 55 60

Ser Lys Asn Thr Thr Ile Thr Ile Pro Ala His Asp Phe Pro Ser Phe
65 70 75 80

Lys Pro Ala Lys Thr Phe Ile Glu Asp Met Lys Lys
85 90

<210> 86

<211> 92

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 86

Met Thr Lys Ala Asp Val Val Asn Ala Ile Ala Lys Ser Thr Gly Ile
1 5 10 15

Asp Lys Glu Thr Thr Leu Lys Val Val Glu Ser Phe Met Asp Thr Ile
20 25 30

Lys Asp Ser Leu Ser Glu Gly Asp Asn Val Tyr Leu Arg Gly Phe Gly
35 40 45

ES 2 754 240 T3

Ser Phe Ile Val Lys Glu Arg Ala Glu Lys Thr Ala Arg Asn Ile Ser
50 55 60

Lys Gln Thr Thr Ile Ile Ile Pro Lys Arg Asn Ile Pro Ala Phe Lys
65 70 75 80

Pro Ser Lys Ile Phe Met Ser Gln Met Lys Gln Asp
85 90

<210> 87

<211> 100

5 <212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 87

Met Asn Lys Ala Glu Leu Ile Asp Val Leu Thr Gln Lys Leu Gly Ser
1 5 10 15

Asp Arg Arg Gln Ala Thr Ala Ala Val Glu Asn Val Val Asp Thr Ile
20 25 30

Val Arg Ala Val His Lys Gly Asp Ser Val Thr Ile Thr Gly Phe Gly
35 40 45

Val Phe Glu Gln Arg Arg Arg Ala Ala Arg Val Ala Arg Asn Pro Arg
50 55 60

Thr Gly Glu Thr Val Lys Val Lys Pro Thr Ser Val Pro Ala Phe Arg
65 70 75 80

Phe Gly Ala Gln Phe Lys Ala Val Val Ser Gly Ala Gln Arg Leu Pro
85 90 95

Ala Glu Gly Pro
100

10

<210> 88

<211> 100

<212> PRT

<213> *Mycobacterium smegmatis*

15

<400> 88

Met Asn Lys Ala Glu Leu Ile Asp Val Leu Thr Thr Lys Met Gly Thr
1 5 10 15

Asp Arg Arg Gln Ala Thr Ala Ala Val Glu Asn Val Val Asp Thr Ile
20 25 30

Val Arg Ala Val His Lys Gly Asp Ser Val Thr Ile Thr Gly Phe Gly
35 40 45

ES 2 754 240 T3

Val Phe Glu Gln Arg Arg Arg Ala Ala Arg Val Ala Arg Asn Pro Arg
50 55 60

Thr Gly Glu Thr Val Lys Val Lys Pro Thr Ser Val Pro Ala Phe Arg
65 70 75 80

Phe Gly Ala Gln Phe Lys Ala Val Ile Ser Gly Ala Gln Lys Leu Pro
85 90 95

Ala Asp Gly Pro
100

<210> 89

<211> 94

5 <212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 89

Met Thr Lys Ser Glu Leu Ile Glu Arg Leu Ala Thr Gln Gln Ser His
1 5 10 15

Ile Pro Ala Lys Thr Val Glu Asp Ala Val Lys Glu Met Leu Glu His
20 25 30

Met Ala Ser Thr Leu Ala Gln Gly Glu Arg Ile Glu Ile Arg Gly Phe
35 40 45

Gly Ser Phe Ser Leu His Tyr Arg Ala Pro Arg Thr Gly Arg Asn Pro
50 55 60

Lys Thr Gly Asp Lys Val Glu Leu Glu Gly Lys Tyr Val Pro His Phe
65 70 75 80

Lys Pro Gly Lys Glu Leu Arg Asp Arg Ala Asn Ile Tyr Gly
85 90

10

<210> 90

<211> 94

<212> PRT

<213> *Salmonella enterica*

15

<400> 90

Met Thr Lys Ser Glu Leu Ile Glu Arg Leu Ala Thr Gln Gln Ser His
1 5 10 15

Ile Pro Ala Lys Ala Val Glu Asp Ala Val Lys Glu Met Leu Glu His
20 25 30

Met Ala Ser Thr Leu Ala Gln Gly Glu Arg Ile Glu Ile Arg Gly Phe
35 40 45

Gly Ser Phe Ser Leu His Tyr Arg Ala Pro Arg Thr Gly Arg Asn Pro
50 55 60

Lys Thr Gly Asp Lys Val Glu Leu Glu Gly Lys Tyr Val Pro His Phe
65 70 75 80

Lys Pro Gly Lys Glu Leu Arg Asp Arg Ala Asn Ile Tyr Gly
85 90

<210> 91

<211> 92

5 <212> PRT

<213> *Vibrio cholerae*

<400> 91

Met Thr Lys Ser Glu Leu Ile Glu Arg Leu Cys Ala Glu Gln Thr His
1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Glu Ile Glu Asp Ala Val Lys Asn Ile Leu Glu His
20 25 30

Met Ala Ser Thr Leu Glu Ala Gly Glu Arg Ile Glu Ile Arg Gly Phe
35 40 45

Gly Ser Phe Ser Leu His Tyr Arg Glu Pro Arg Val Gly Arg Asn Pro
50 55 60

Lys Thr Gly Asp Lys Val Glu Leu Glu Gly Lys Tyr Val Pro His Phe
65 70 75 80

Lys Pro Gly Lys Glu Leu Arg Glu Arg Val Asn Leu
85 90

10

<210> 92

<211> 94

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

15

<400> 92

Met Thr Lys Ser Glu Leu Ile Glu Arg Ile Val Thr His Gln Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Asp Val Glu Leu Ala Ile Lys Thr Met Leu Glu Gln
20 25 30

Met Ser Gln Ala Leu Ala Thr Gly Asp Arg Ile Glu Ile Arg Gly Phe
35 40 45

Gly Ser Phe Ser Leu His Tyr Arg Ala Pro Arg Val Gly Arg Asn Pro

50

55

60

Lys Thr Gly Glu Ser Val Arg Leu Asp Gly Lys Phe Val Pro His Phe
65 70 75 80

Lys Pro Gly Lys Glu Leu Arg Asp Arg Val Asn Glu Pro Glu
85 90

<210> 93

<211> 94

5 <212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 93

Met Thr Lys Ser Glu Leu Met Glu Lys Leu Ser Ala Lys Gln Pro Thr
1 5 10 15

Leu Pro Ala Lys Glu Ile Glu Asn Met Val Lys Gly Ile Leu Glu Phe
20 25 30

Ile Ser Gln Ser Leu Glu Asn Gly Asp Arg Val Glu Val Arg Gly Phe
35 40 45

Gly Ser Phe Ser Leu His His Arg Gln Pro Arg Leu Gly Arg Asn Pro
50 55 60

Lys Thr Gly Asp Ser Val Asn Leu Ser Ala Lys Ser Val Pro Tyr Phe
65 70 75 80

Lys Ala Gly Lys Glu Leu Lys Ala Arg Val Asp Val Gln Ala
85 90

10

<210> 94

<211> 95

<212> PRT

<213> *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

15

<400> 94

Met Thr Lys Ser Glu Leu Ile Glu Leu Leu Val Gln Lys Asn Ser Asn
1 5 10 15

Ile Pro Val Lys His Val Glu Glu Ala Val Lys Ala Ile Leu Glu Gln
20 25 30

Met Ser Tyr Val Leu Glu His Gly Glu Arg Ile Glu Val Arg Gly Phe
35 40 45

Gly Ser Phe Ser Leu His Cys Arg Gln Pro Arg Ile Gly Arg Asn Pro
50 55 60

Lys Thr Gly Glu Gln Val Lys Leu Asp Ala Lys Cys Val Pro Tyr Phe
65 70 75 80

Lys Ala Gly Lys Glu Leu Arg Glu Arg Val Asp Val Tyr Ala Ala
85 90 95

<210> 95

<211> 98

<212> PRT

<213> *Neisseria gonorrhoeae*

<400> 95

Met Val Arg Leu Ala Glu Val Phe Ala Ala Lys Asn Gly Thr His Leu
1 5 10 15

Leu Ala Lys Asp Val Glu Tyr Ser Val Lys Val Leu Val Asp Thr Met
20 25 30

Thr Arg Ser Leu Ala Arg Gly Gln Arg Ile Glu Ile Arg Gly Phe Gly
35 40 45

Ser Phe Asp Leu Asn His Arg Pro Ala Arg Ile Gly Arg Asn Pro Lys
50 55 60

Thr Gly Glu Arg Val Glu Val Pro Glu Lys His Val Pro His Phe Lys
65 70 75 80

Pro Gly Lys Glu Leu Arg Glu Arg Val Asp Leu Ala Leu Lys Glu Asn
85 90 95

Ala Asn

<210> 96

<211> 104

<212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 96

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

Lys Asn Gly Thr His Leu Leu Ala Lys Asp Val Glu Tyr Ser Val Lys
20 25 30

Val Leu Val Asp Thr Met Thr Arg Ser Leu Ala Arg Gly Gln Arg Ile
35 40 45

Glu Ile Arg Gly Phe Gly Ser Phe Asp Leu Asn His Arg Pro Ala Arg
50 55 60

Ile Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly Glu Arg Val Glu Val Pro Glu Lys
65 70 75 80

His Val Pro His Phe Lys Pro Gly Lys Glu Leu Arg Glu Arg Val Asp
85 90 95

Leu Ala Leu Lys Glu Asn Ala Asn
100

<210> 97

<211> 107

5 <212> PRT

<213> *Burkholderia cenocepacia*

<400> 97

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

Leu Val Leu Lys Asp Ala Asp Phe Ala Val Lys Thr Met Leu Asp Ala
20 25 30

Met Ser Asp Ala Leu Ala Lys Gly His Arg Ile Glu Ile Arg Gly Phe
35 40 45

Gly Ser Phe Gly Leu Asn Arg Arg Pro Ala Arg Val Gly Arg Asn Pro
50 55 60

Lys Ser Gly Glu Lys Val Gln Val Pro Glu Lys Phe Val Pro His Phe
65 70 75 80

Lys Pro Gly Lys Glu Leu Arg Glu Arg Val Asp Gly Arg Ala Gly Glu
85 90 95

Pro Leu Lys Ala Asp Asp Pro Asp Asp Asp Arg
100 105

10

<210> 98

<211> 107

<212> PRT

<213> *Burkholderia pseudomallei*

15

<400> 98

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

Leu Val Leu Lys Asp Ala Asp Phe Ala Val Lys Thr Met Leu Asp Ala
20 25 30

Met Ser Asp Ala Leu Ser Lys Gly His Arg Ile Glu Ile Arg Gly Phe
35 40 45

Gly Ser Phe Gly Leu Asn Arg Arg Pro Ala Arg Val Gly Arg Asn Pro
50 55 60

Lys Ser Gly Glu Lys Val Gln Val Pro Glu Lys His Val Pro His Phe
65 70 75 80

Lys Pro Gly Lys Glu Leu Arg Glu Arg Val Asp Gly Arg Ala Gly Glu
85 90 95

Pro Leu Lys Asn Asp Glu Pro Glu Asp Ala Gln
100 105

<210> 99

<211> 101

<212> PRT

<213> *Bordetella pertussis*

<400> 99

Met Thr Lys Ser Glu Leu Ile Ala Ala Leu Ala Ala Arg Tyr Pro Gln
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Thr Asp Tyr Ala Val Lys Thr Met Leu Asp Ala
20 25 30

Met Thr Gln Ala Leu Ala Ser Gly Gln Arg Ile Glu Ile Arg Gly Phe
35 40 45

Gly Ser Phe Ser Leu Ser Gln Arg Ser Pro Arg Ile Gly Arg Asn Pro
50 55 60

Lys Ser Gly Glu Gln Val Leu Val Pro Gly Lys Gln Val Pro His Phe
65 70 75 80

Lys Pro Gly Lys Glu Leu Arg Glu Trp Val Asp Leu Val Gly Asn Asp
85 90 95

Gln Gly Asp Asp Ser
100

<210> 100

<211> 108

<212> PRT

<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 100

Met Ser Phe Ser Arg Arg Pro Lys Val Thr Lys Ser Asp Ile Val Asp
1 5 10 15

Gln Ile Ser Leu Asn Ile Lys Asn Asn Asn Leu Lys Leu Glu Lys Lys

ES 2 754 240 T3

	20	25	30
	Tyr Ile Arg Leu Val Ile Asp Ala Phe Phe Glu Glu Leu Lys Ser Asn		
	35	40	45
	Leu Cys Ser Asn Asn Val Ile Glu Phe Arg Ser Phe Gly Thr Phe Glu		
	50	55	60
	Val Arg Lys Arg Lys Gly Arg Leu Asn Ala Arg Asn Pro Gln Thr Gly		
	65	70	75 80
	Glu Tyr Val Lys Val Leu Asp His His Val Ala Tyr Phe Arg Pro Gly		
	85	90	95
	Lys Asp Leu Lys Glu Arg Val Trp Gly Ile Lys Gly		
	100	105	
5	<210> 101 <211> 16 <212> PRT <213> <i>Streptococcus</i> sp.		
10	<400> 101 Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly 1 5 10 15		
15	<210> 102 <211> 16 <212> PRT <213> <i>Escherichia coli</i>		
20	<400> 102 Asp Leu Arg Asp Lys Asn Gln Arg Pro Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly 1 5 10 15		
25	<210> 103 <211> 16 <212> PRT <213> <i>Salmonella enterica</i>		
30	<400> 103 Asp Leu Arg Asp Lys Asn Gln Arg Pro Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly 1 5 10 15		
35	<210> 104 <211> 16 <212> PRT <213> <i>Vibrio cholerae</i>		
	<400> 104 Asp Leu Arg Asp Lys Asn Glu Arg Pro Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly 1 5 10 15		
	<210> 105 <211> 16 <212> PRT		

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 105

Asp Leu Arg Asp Lys Arg Gln Arg Pro Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

5

<210> 106

<211> 16

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

10

<400> 106

Glu Leu Arg Asp Lys Ser Ser Arg Pro Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

<210> 107

15

<211> 16

<212> PRT

<213> *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

<400> 107

Glu Leu Arg Asp Lys Ala Ser Arg Pro Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

20

<210> 108

<211> 16

<212> PRT

25

<213> *Moraxella catarrhalis*

<400> 108

Glu Leu Lys Asp Lys Lys Pro Arg Pro Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

30

<210> 109

<211> 16

<212> PRT

<213> *Neisseria gonorrhoeae*

35

<400> 109

Gln Leu Arg Asp Lys Pro Gln Arg Pro Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

<210> 110

40

<211> 16

<212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 110

Gln Leu Arg Asp Lys Pro Gln Arg Pro Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

45

<210> 111

<211> 16

<212> PRT

<213> *Burkholderia cenocepacia*

50

<400> 111

Gln Leu Arg Asp Lys Pro Gln Arg Pro Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

<210> 112

55

<211> 16

<212> PRT
 <213> *Burkholderia pseudomallei*

<400> 112
 Gln Leu Arg Asp Lys Pro Gln Arg Pro Gly Arg Asn Pro Asn Thr Gly
 1 5 10 15

5

<210> 113
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Bordetella pertussis*

10

<400> 113
 Gln Val Arg Asp Lys Pro Pro Arg Pro Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
 1 5 10 15

15

<210> 114
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Prevotella melaninogenica*

20

<400> 114
 Glu Val Lys Lys Arg Leu Glu Arg Val Met Val Asn Pro Ser Thr Gly
 1 5 10 15

25

<210> 115
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Prevotella intermedia*

30

<400> 115
 Glu Val Lys Lys Arg Leu Glu Arg Ile Met Thr Asn Pro Ala Thr Gly
 1 5 10 15

35

<210> 116
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Treponema palladium*

40

<400> 116
 Glu Ser Arg Val Arg Lys Ala Ser Val Gly Lys Ser Ile Asn Thr Gly
 1 5 10 15

45

<210> 117
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Prevotella melaninogenica*

50

<400> 117
 Lys Val Gln Ala Val Lys Pro Arg Glu Ser Val Asn Val Asn Thr Gly
 1 5 10 15

<210> 118
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Prevotella intermedia*

<400> 118
 Lys Val Gln Ala Val Lys Pro Arg Glu Ser Val Asn Val Asn Thr Gly
 1 5 10 15

<210> 119
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> *Staphylococcus aureus*

 <400> 119
Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly
1 5 10 15

 10 <210> 120
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

 15 <400> 120
Lys Val Asn His Arg Ala Glu Arg Thr Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly
1 5 10 15

 20 <210> 121
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus epidermidis*

 <400> 121
Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly
1 5 10 15

 25 <210> 122
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus sobrinus*

 30 <400> 122
Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly
1 5 10 15

 35 <210> 123
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pyogeneses*

 <400> 123
Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly
1 5 10 15

 40 <210> 124
 <211> 16
 <212> PRT
 45 <213> *Streptococcus gallolyticus*

 <400> 124
Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly
1 5 10 15

 50 <210> 125
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus agalactiae*

 55 <400> 125

Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly
1 5 10 15

5 <210> 126
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pneumoniae*

10 <400> 126
Glu Val Arg Glu Arg Ala Glu Arg Lys Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly
1 5 10 15

15 <210> 127
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus gordonii*

20 <400> 127
Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly
1 5 10 15

25 <210> 128
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus mutans*

30 <400> 128
Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly
1 5 10 15

35 <210> 129
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Enterococcus faecalis*

40 <400> 129
Glu Val Arg Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly
1 5 10 15

45 <210> 130
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

50 <400> 130
Lys Val Asn Glu Arg Ala Ala Arg Thr Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly
1 5 10 15

55 <210> 131
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Vibrio cholerae*

<400> 131
Lys Val Asn His Arg Ser Ala Arg Thr Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly
1 5 10 15

<210> 132
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Bordetella pertussis*

<400> 132
Ala Val Ser Ala Arg Ala Ala Arg Thr Gly Arg Asn Pro Arg Thr Gly
1 5 10 15

5 <210> 133
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

10 <400> 133
Ala Val Lys Glu Arg Ala Ala Arg Thr Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly
1 5 10 15

15 <210> 134
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

20 <400> 134
Ser Val Arg Thr Arg Ala Ala Arg Thr Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

25 <210> 135
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Prevotella melaninogenica*

30 <400> 135
Ala Thr Thr Glu Arg Pro Ala His Glu Gly Ile Asn Pro Arg Ser Lys
1 5 10 15

35 <210> 136
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Prevotella intermedia*

40 <400> 136
Ser Val Thr Glu Arg Pro Ala His Glu Gly Ile Asn Pro Ala Thr Lys
1 5 10 15

45 <210> 137
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Treponema denticola*

50 <400> 137
Phe Ala Val Leu His Gly Arg Lys Asn Ala Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

<210> 138
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 138
Ser Val Ser Glu Arg Ala Ala Arg Lys Gly Ile Asn Pro Lys Thr Lys
1 5 10 15

<210> 139
 <211> 16
 <212> PRT

<213> *Helicobacter pylori*

<400> 139

Glu Thr Ala Glu Gln Lys Gly Lys Glu Gly Lys Val Pro Gly Ser Asp
1 5 10 15

5

<210> 140

<211> 17

<212> PRT

<213> *Prevotella melaninogenica*

10

<400> 140

Phe Ile Val Lys His Arg Ala Glu Lys Thr Ala Arg Asn Ile Ser Lys
1 5 10 15

Asn

<210> 141

15

<211> 17

<212> PRT

<213> *Prevotella intermedia*

<400> 141

Phe Ile Val Lys His Arg Ala Glu Lys Thr Ala Arg Asn Ile Ser Lys
1 5 10 15

Asn

20

<210> 142

<211> 16

<212> PRT

25

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 142

Ile Val Lys Glu Arg Ala Glu Lys Thr Ala Arg Asn Ile Ser Lys Gln
1 5 10 15

30

<210> 143

<211> 16

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

35

<400> 143

Glu Gln Arg Arg Arg Ala Ala Arg Val Ala Arg Asn Pro Arg Thr Gly
1 5 10 15

<210> 144

<211> 16

40

<212> PRT

<213> *Mycobacterium smegmatis*

<400> 144

Glu Gln Arg Arg Arg Ala Ala Arg Val Ala Arg Asn Pro Arg Thr Gly
1 5 10 15

45

<210> 145

<211> 16

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 145

Ser Leu His Tyr Arg Ala Pro Arg Thr Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

<210> 146

<211> 16

<212> PRT

<213> *Salmonella enterica*

<400> 146

Ser Leu His Tyr Arg Ala Pro Arg Thr Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

<210> 147

<211> 16

<212> PRT

<213> *Vibrio cholerae*

<400> 147

Ser Leu His Tyr Arg Glu Pro Arg Val Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

<210> 148

<211> 16

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 148

Ala Val Lys Glu Arg Ala Ala Arg Thr Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly
1 5 10 15

<210> 149

<211> 16

<212> PRT

<213> *Moraxella catarrhalis*

<400> 149

Ser Val Lys Glu Arg Ala Ala Arg Met Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

<210> 150

<211> 16

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 150

Ser Leu His Tyr Arg Ala Pro Arg Val Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

<210> 151

<211> 16

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

<400> 151

Ser Leu His His Arg Gln Pro Arg Leu Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

<210> 152
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
 5
 <400> 152
Ser Leu His Cys Arg Gln Pro Arg Ile Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

<210> 153
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Neisseria gonorrhoeae*
 10
 <400> 153
Asp Leu Asn His Arg Pro Ala Arg Ile Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

<210> 154
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*
 15
 <400> 154
Asp Leu Asn His Arg Pro Ala Arg Ile Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly
1 5 10 15

<210> 155
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia cenocepacia*
 20
 <400> 155
Gly Leu Asn Arg Arg Pro Ala Arg Val Gly Arg Asn Pro Lys Ser Gly
1 5 10 15

<210> 156
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia pseudomallei*
 25
 <400> 156
Gly Leu Asn Arg Arg Pro Ala Arg Val Gly Arg Asn Pro Lys Ser Gly
1 5 10 15

<210> 157
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Bordetella pertussis*
 30
 <400> 157
Ser Leu Ser Gln Arg Ser Pro Arg Ile Gly Arg Asn Pro Lys Ser Gly
1 5 10 15

<210> 158
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Moraxella catarrhalis*
 35
 <400> 158

Cys Leu His His Arg Ser Ala Arg Ile Ala Arg Asn Pro Arg Thr Gly
1 5 10 15

5 <210> 159
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 159
Glu Val Arg Lys Arg Lys Gly Arg Leu Asn Ala Arg Asn Pro Gln Thr
1 5 10 15

Gly

10 <210> 160
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pyogeneses*

15 <400> 160
Ala Phe Lys Ala Gly Lys
1 5

20 <210> 161
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pyogeneses*

25 <400> 161
Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
1 5

30 <210> 162
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pyogeneses*

<400> 162
Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys
1 5 10 15

Asp Ala Val Lys
20

35 <210> 163
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus gallolyticus*

40 <400> 163
Ala Phe Lys Ala Gly Lys
1 5

45 <210> 164
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus gallolyticus*

<400> 164
Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
 1 5

5 <210> 165
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus gallolyticus*

<400> 165
Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys
 1 5 10 15

10 **Asp Ala Val Lys**
 20

15 <210> 166
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus sobrinus*

<400> 166
Ala Phe Lys Ala Gly Lys
 1 5

20 <210> 167
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus sobrinus*

25 <400> 167
Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
 1 5

30 <210> 168
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus sobrinus*

<400> 168
Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys
 1 5 10 15

35 **Asp Ala Val Lys**
 20

40 <210> 169
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus agalactiae*

<400> 169
Ala Phe Lys Ala Gly Lys
 1 5

45 <210> 170
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus agalactiae*

<400> 170
Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
 1 5

5 <210> 171
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus agalactiae*

10 <400> 171
Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys
 1 5 10 15

Asp Ala Val Lys
 20

15 <210> 172
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pneumoniae*

20 <400> 172
Ala Phe Lys Ala Gly Lys
 1 5

25 <210> 173
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pneumoniae*

30 <400> 173
Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
 1 5

35 <210> 174
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pneumoniae*

40 <400> 174
Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys
 1 5 10 15

Asp Ala Val Lys
 20

45 <210> 175
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus gordonii*

50 <400> 175
Ala Phe Lys Ala Gly Lys
 1 5

<210> 176
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus gordonii*

<400> 176
Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
1 5

5 <210> 177
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus gordonii*

<400> 177
Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys
1 5 10 15

10 **Asp Ala Val Lys**
20

<210> 178
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> *Streptococcus mutans*

<400> 178
Ala Phe Lys Ala Gly Lys
1 5

20 <210> 179
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus mutans*

25 <400> 179
Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
1 5

30 <210> 180
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus mutans*

<400> 180
Ile Lys Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys
1 5 10 15

35 **Asp Ala Val Lys**
20

<210> 181
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Enterococcus faecalis*

40 <400> 181
Ala Phe Lys Pro Gly Lys
1 5

45 <210> 182
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Enterococcus faecalis*

<400> 182
Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
 1 5

5 <210> 183
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Enterococcus faecalis*

<400> 183
Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Lys Pro Gly Lys Ala Leu Lys
 1 5 10 15

Asp Ala Val Lys
 20

10

<210> 184
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 184
Ala Phe Lys Ala Gly Lys
 1 5

20 <210> 185
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*

25 <400> 185
Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
 1 5

<210> 186
 <211> 20
 30 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 186
Ile Pro Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys
 1 5 10 15

Asp Ala Val Lys
 20

35 <210> 187
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus epidermidis*

40 <400> 187
Ala Phe Lys Ala Gly Lys
 1 5

45 <210> 188
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus epidermidis*

<400> 188
Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
 1 5

5 <210> 189
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus epidermidis*

<400> 189
Ile Pro Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys
 1 5 10 15

Asp Ala Val Lys
 20

10 <210> 190
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> *Haemophilus influenzae*

<400> 190
Ala Phe Val Ser Gly Lys
 1 5

20 <210> 191
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

25 <400> 191
Ala Leu Lys Asp Ala Ile Lys
 1 5

30 <210> 192
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

<400> 192
Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Val Ser Gly Lys Ala Leu Lys
 1 5 10 15

Asp Ala Ile Lys
 20

35 <210> 193
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

40 <400> 193
Ala Phe Val Ser Gly Lys
 1 5

45 <210> 194
 <211> 7
 <212> PRT

<213> *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

<400> 194
Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
1 5

5
 <210> 195
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

10
 <400> 195
Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ala Phe Val Ser Gly Lys Ala Leu Lys
1 5 10 15

Asp Ala Val Lys
20

15
 <210> 196
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Vibrio cholerae*

<400> 196
Ala Phe Val Ala Gly Lys
1 5

20
 <210> 197
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Vibrio cholerae*

25
 <400> 197
Ala Leu Lys Asp Ala Ile Lys
1 5

30
 <210> 198
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Vibrio cholerae*

35
 <400> 198
Ile Ala Ala Ala Asn Val Pro Ala Phe Val Ala Gly Lys Ala Leu Lys
1 5 10 15

Asp Ala Ile Lys
20

40
 <210> 199
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

<400> 199
Ala Phe Val Ser Gly Lys
1 5

45
 <210> 200

<211> 7
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5 <400> 200
Ala Leu Lys Asp Ala Val Lys
 1 5

<210> 201
 <211> 20
 10 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

<400> 201
Ile Ala Ala Ala Asn Val Pro Ala Phe Val Ser Gly Lys Ala Leu Lys
 1 5 10 15

Asp Ala Val Lys
 20

15 <210> 202
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

20 <400> 202
Gly Phe Lys Ala Gly Lys
 1 5

25 <210> 203
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 203
Ala Leu Lys Asp Ala Val Asn
 1 5

30 <210> 204
 <211> 20
 <212> PRT
 35 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 204
Ile Ala Ala Ala Lys Ile Pro Gly Phe Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys
 1 5 10 15

Asp Ala Val Asn
 20

40 <210> 205
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

45 <400> 205
Ser Phe Arg Ala Gly Lys
 1 5

<210> 206
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> *Escherichia coli*

 <400> 206
Ala Leu Lys Asp Ala Val Asn
1 5

 10 <210> 207
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

 15 <400> 207
Ile Ala Ala Ala Lys Val Pro Ser Phe Arg Ala Gly Lys Ala Leu Lys
1 5 10 15

Asp Ala Val Asn
20

 20 <210> 208
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Vibrio cholerae*

 <400> 208
Ser Phe Lys Ala Gly Lys
1 5

 25 <210> 209
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Vibrio cholerae*
 30 <400> 209
Ala Leu Lys Asp Ala Cys Asn
1 5

 35 <210> 210
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Vibrio cholerae*

 <400> 210
Ile Ala Glu Ala Lys Val Pro Ser Phe Lys Ala Gly Lys Ala Leu Lys
1 5 10 15
 40

Asp Ala Cys Asn
20

 45 <210> 211
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Bordetella pertussis*

 <400> 211

Lys Phe Arg Pro Gly Lys
1 5

5 <210> 212
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Bordetella pertussis*

10 <400> 212
Ala Leu Lys Asp Ala Val Asn
1 5

15 <210> 213
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Bordetella pertussis*

20 <400> 213
Ile Lys Lys Ala Lys Val Pro Lys Phe Arg Pro Gly Lys Ala Leu Lys
1 5 10 15

Asp Ala Val Asn
20

25 <210> 214
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Prevotella melaninogenica*

30 <400> 214
Lys Phe Lys Ala Gly Ala
1 5

35 <210> 215
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Prevotella melaninogenica*

40 <400> 215
Glu Leu Ala Asp Ala Val Asn Lys
1 5

45 <210> 216
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Prevotella melaninogenica*

50 <400> 216
Ala Ala Lys Lys Val Ala Lys Phe Lys Ala Gly Ala Glu Leu Ala Asp
1 5 10 15

Ala Val Asn Lys
20

55 <210> 217
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Prevotella intermedia*

<400> 217
Lys Phe Lys Pro Gly Ala
1 5

5 <210> 218
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Prevotella intermedia*

10 <400> 218
Glu Leu Ala Asp Ala Val Asn Ala
1 5

15 <210> 219
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Prevotella intermedia*

<400> 219
Ala Ala Lys Lys Val Ala Lys Phe Lys Pro Gly Ala Glu Leu Ala Asp
1 5 10 15

Ala Val Asn Ala
20

20 <210> 220
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Moraxella catarrhalis*

25 <400> 220
Ser Phe Lys Ala Gly Lys
1 5

30 <210> 221
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Moraxella catarrhalis*

35 <400> 221
Val Leu Lys Glu Ser Val Asn
1 5

40 <210> 222
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Moraxella catarrhalis*

<400> 222
Ile Ala Ala Ser Lys Val Pro Ser Phe Lys Ala Gly Lys Val Leu Lys
1 5 10 15

Glu Ser Val Asn
20

45 <210> 223
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 223
Arg Phe Lys Pro Gly Ser
 1 5

5 <210> 224
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Porphyromonas gingivalis*

10 <400> 224
Thr Leu Glu Leu Lys
 1 5

15 <210> 225
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 225
Ile Ser Ile Pro Ala Arg Lys Val Val Arg Phe Lys Pro Gly Ser Thr
 1 5 10 15

Leu Glu Leu Lys
 20

20 <210> 226
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Helicobacter pylori*

25 <400> 226
Lys Phe Lys Pro Gly Lys
 1 5

30 <210> 227
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Helicobacter pylori*

35 <400> 227
Thr Leu Lys Gln Lys Val Glu Glu Gly Lys
 1 5 10

40 <210> 228
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Helicobacter pylori*

<400> 228
Lys Arg Val Pro Lys Phe Lys Pro Gly Lys Thr Leu Lys Gln Lys Val
 1 5 10 15

Glu Glu Gly Lys
 20

45 <210> 229
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Prevotella melaninogenica*

<400> 229
Ser Phe Lys Pro Ala Lys
1 5

5 <210> 230
<211> 8
<212> PRT
<213> *Prevotella melaninogenica*

10 <400> 230
Thr Phe Ile Glu Asp Met Lys Lys
1 5

15 <210> 231
<211> 20
<212> PRT
<213> *Prevotella melaninogenica*

<400> 231
Pro Ala His Asp Phe Pro Ser Phe Lys Pro Ala Lys Thr Phe Ile Glu
1 5 10 15

Asp Met Lys Lys
20

20 <210> 232
<211> 6
<212> PRT
<213> *Prevotella intermedia*

25 <400> 232
Ser Phe Lys Pro Ala Lys
1 5

30 <210> 233
<211> 8
<212> PRT
<213> *Prevotella intermedia*

35 <400> 233
Thr Phe Ile Glu Asp Met Lys Lys
1 5

40 <210> 234
<211> 20
<212> PRT
<213> *Prevotella intermedia*

<400> 234
Pro Ala His Asp Phe Pro Ser Phe Lys Pro Ala Lys Thr Phe Ile Glu
1 5 10 15

Asp Met Lys Lys
20

45 <210> 235
<211> 6
<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 235

Ala Phe Lys Pro Ser Lys
1 5

5

<210> 236

<211> 9

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

10

<400> 236

Ile Phe Met Ser Gln Met Lys Gln Asp
1 5

<210> 237

15

<211> 20

<212> PRT

<213> *Porphyromonas gingivalis*

<400> 237

Lys Arg Asn Ile Pro Ala Phe Lys Pro Ser Lys Ile Phe Met Ser Gln
1 5 10 15

Met Lys Gln Asp
20

20

<210> 238

<211> 6

<212> PRT

25

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 238

Ala Phe Arg Pro Gly Ala
1 5

30

<210> 239

<211> 22

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

35

<400> 239

Gln Phe Lys Ala Val Val Ser Gly Ala Gln Arg Leu Pro Ala Glu Gly
1 5 10 15

Pro Ala Val Lys Arg Gly
20

40

<210> 240

<211> 20

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 240

Ala Lys Arg Pro Ala Thr Lys Ala Pro Ala Lys Lys Ala Thr Ala Arg
 1 5 10 15

Arg Gly Arg Lys
 20

<210> 241
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium smegmatis*

<400> 241
Ala Phe Arg Pro Gly Ala
 1 5

<210> 242
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium smegmatis*

<400> 242
Gln Phe Lys Ala Val Ile Ser Gly Ala Gln Lys Leu Pro Ala Asp Gly
 1 5 10 15

Pro Ala Val Lys Arg Gly
 20

<210> 243
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Mycobacterium smegmatis*

<400> 243
Thr Lys Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Ala Lys Lys Ala Pro Ala Lys
 1 5 10 15

Lys Gly Arg Arg
 20

<210> 244
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Prevotella melaninogenica*

<400> 244
Asn Phe Lys Pro Ala Ala
 1 5

<210> 245
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Prevotella melaninogenica*

<400> 245
Thr Ile Lys Gly His Val Arg Lys Gly Gly Gln Asp Asn Gly
 1 5 10

<210> 246

<211> 20
 <212> PRT
 <213> *Prevotella melaninogenica*
 5 <400> 246
Asn Phe Lys Pro Ala Ala Thr Ile Lys Gly His Val Arg Lys Gly Gly
1 5 10 15

Gln Asp Asn Gly
20

 <210> 247
 <211> 6
 10 <212> PRT
 <213> *Prevotella intermedia*

 <400> 247
Asn Phe Arg Ala Thr Ala
1 5

 15 <210> 248
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Prevotella intermedia*
 20 <400> 248
Ser Val Lys Glu Lys Leu Lys Lys Gly Gly Ala Glu
1 5 10

 25 <210> 249
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Prevotella intermedia*

 <400> 249
Val Leu Asn Phe Arg Ala Thr Ala Ser Val Lys Glu Lys Leu Lys Lys
1 5 10 15

Gly Gly Ala Glu
20
 30 <210> 250
 <211> 6
 <212> PRT
 35 <213> *Escherichia coli*

 <400> 250
Thr Phe Arg Pro Gly Gln
1 5

 40 <210> 251
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*
 45 <400> 251
Lys Leu Lys Ser Arg Val Glu Asn Ala Ser Pro Lys Asp Glu
1 5 10

<210> 252
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*
 5
 <400> 252
Thr Phe Arg Pro Gly Gln Lys Leu Lys Ser Arg Val Glu Asn Ala Ser
1 5 10 15

Pro Lys Asp Glu
20

 <210> 253
 10 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Salmonella enterica*

 <400> 253
Thr Phe Arg Pro Gly Gln
1 5
 15

 <210> 254
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> *Salmonella enterica*

 <400> 254
Lys Leu Lys Ser Arg Val Glu Asn Ala Ser Pro Lys Glu Glu
1 5 10

 25 <210> 255
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Salmonella enterica*

 30 <400> 255
Thr Phe Arg Pro Gly Gln Lys Leu Lys Ser Arg Val Glu Asn Ala Ser
1 5 10 15

Pro Lys Glu Glu
20

 <210> 256
 <211> 6
 35 <212> PRT
 <213> *Vibrio cholerae*

 <400> 256
Thr Phe Arg Pro Gly Gln
1 5
 40

 <210> 257
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Vibrio cholerae*
 45
 <400> 257

Lys Leu Lys Ala Arg Val Glu Asn Ile Lys Val Glu Lys
 1 5 10

<210> 258

<211> 20

5 <212> PRT

<213> *Vibrio cholerae*

<400> 258

Val Thr Phe Arg Pro Gly Gln Lys Leu Lys Ala Arg Val Glu Asn Ile
 1 5 10 15

Lys Val Glu Lys
 20

10

<210> 259

<211> 6

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

15

<400> 259

Thr Phe Arg Pro Gly Gln
 1 5

<210> 260

20

<211> 14

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 260

Lys Leu Lys Ala Arg Val Glu Ala Tyr Ala Gly Thr Lys Ser
 1 5 10

25

<210> 261

<211> 20

<212> PRT

30

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 261

Thr Phe Arg Pro Gly Gln Lys Leu Lys Ala Arg Val Glu Ala Tyr Ala
 1 5 10 15

Gly Thr Lys Ser
 20

35

<210> 262

<211> 6

<212> PRT

<213> *Burkholderia cenocepacia*

40

<400> 262

Thr Phe His Ala Ser Gln
 1 5

<210> 263

<211> 11

45

<212> PRT

<213> *Burkholderia cenocepacia*

<400> 263
Lys Leu Lys Ala Leu Val Glu Asn Gly Ala Glu
1 5 10

5 <210> 264
<211> 20
<212> PRT
<213> *Burkholderia cenocepacia*

10 <400> 264
Arg Val Val Thr Phe His Ala Ser Gln Lys Leu Lys Ala Leu Val Glu
1 5 10 15

Asn Gly Ala Glu
20

15 <210> 265
<211> 6
<212> PRT
<213> *Burkholderia pseudomallei*

<400> 265
Thr Phe His Ala Ser Gln
1 5

20 <210> 266
<211> 16
<212> PRT
<213> *Burkholderia pseudomallei*

25 <400> 266
Lys Leu Lys Ala Leu Val Glu Asn Gly Ala Glu Pro Asp Leu Ala Arg
1 5 10 15

30 <210> 267
<211> 20
<212> PRT
<213> *Burkholderia pseudomallei*

<400> 267
His Ala Ser Gln Lys Leu Lys Ala Leu Val Glu Asn Gly Ala Glu Pro
1 5 10 15

35 **Asp Leu Ala Arg**
20

40 <210> 268
<211> 6
<212> PRT
<213> *Bordetella pertussis*

<400> 268
Thr Phe His Ala Ser Gln
1 5

45 <210> 269
<211> 19
<212> PRT

<213> *Bordetella pertussis*

<400> 269

Lys Leu Lys Ser Val Val Glu Gln Pro Asn Ser Pro Pro Asp Pro Ala
 1 5 10 15

Ser Ala Glu

5

<210> 270

<211> 20

<212> PRT

<213> *Bordetella pertussis*

10

<400> 270

Gln Lys Leu Lys Ser Val Val Glu Gln Pro Asn Ser Pro Pro Asp Pro
 1 5 10 15

Ala Ser Ala Glu
 20

15

<210> 271

<211> 6

<212> PRT

<213> *Neisseria gonorrhoeae*

20

<400> 271

Thr Phe His Ala Ser Gln
 1 5

25

<210> 272

<211> 14

<212> PRT

<213> *Neisseria gonorrhoeae*

<400> 272

Lys Leu Lys Gly Met Val Glu His Tyr Tyr Asp Lys Gln Arg
 1 5 10

30

<210> 273

<211> 20

<212> PRT

<213> *Neisseria gonorrhoeae*

35

<400> 273

Thr Phe His Ala Ser Gln Lys Leu Lys Gly Met Val Glu His Tyr Tyr
 1 5 10 15

Asp Lys Gln Arg
 20

40

<210> 274

<211> 6

<212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

45

<400> 274

Thr Phe His Ala Ser Gln
1 5

5 <210> 275
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*

10 <400> 275
Lys Leu Lys Ser Met Val Glu His Tyr Tyr Asp Lys Gln Arg
1 5 10

15 <210> 276
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*

20 <400> 276
Thr Phe His Ala Ser Gln Lys Leu Lys Ser Met Val Glu His Tyr Tyr
1 5 10 15

Asp Lys Gln Arg
20

25 <210> 277
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

30 <400> 277
Thr Phe Lys Pro Gly Gln
1 5

35 <210> 278
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

40 <400> 278
Lys Leu Arg Ala Arg Val Glu Lys Thr Lys
1 5 10

45 <210> 279
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

50 <400> 279
Arg Arg Val Val Thr Phe Lys Pro Gly Gln Lys Leu Arg Ala Arg Val
1 5 10 15

Glu Lys Thr Lys
20

55 <210> 280
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

<400> 280
Val Phe Lys Pro Gly Gln
 1 5

5 <210> 281
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

10 <400> 281
Lys Leu Arg Asn Arg Val Glu Lys Val Lys Pro Lys Ala
 1 5 10

15 <210> 282
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Val Val Phe Lys Pro Gly Gln Lys Leu Arg Asn Arg Val Glu Lys Val
 1 5 10 15

Lys Pro Lys Ala
 20

20 <210> 283
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Moraxella catarrhalis*

25 <400> 283
Thr Phe Lys Ala Gly Gln
 1 5

30 <210> 284
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Moraxella catarrhalis*

35 <400> 284
Lys Leu Arg Gly Trp Ile Asp Ser Gln Asn Glu Gly
 1 5 10

40 <210> 285
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Moraxella catarrhalis*

<400> 285
Val Val Thr Phe Lys Ala Gly Gln Lys Leu Arg Gly Trp Ile Asp Ser
 1 5 10 15

Gln Asn Glu Gly
 20

45 <210> 286
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Treponema palladium*

<400> 286
Val Phe Arg Pro Ser Lys
1 5

5 <210> 287
<211> 17
<212> PRT
<213> *Treponema palladium*

10 <400> 287
Arg Leu Lys Ser Ala Val Arg Gly Tyr Arg Ser Gly Glu Val Gly Ala
1 5 10 15

Asp

15 <210> 288
<211> 20
<212> PRT
<213> *Treponema palladium*

<400> 288
Pro Ser Lys Arg Leu Lys Ser Ala Val Arg Gly Tyr Arg Ser Gly Glu
1 5 10 15

Val Gly Ala Asp
20

20 <210> 289
<211> 6
<212> PRT
<213> *Prevotella melaninogenica*

25 <400> 289
Ser Phe Thr Pro Asp Thr
1 5

30 <210> 290
<211> 22
<212> PRT
<213> *Prevotella melaninogenica*

<400> 290
Val Met Lys Glu Leu Val Asn Lys Pro Phe Ser Gln Phe Glu Thr Val
1 5 10 15

Val Ile Asn Asp Gly Val
20

35 <210> 291
<211> 20
<212> PRT
<213> *Prevotella melaninogenica*

40 <400> 291

Met Gln Ala Gly Asp Thr Met Lys Val Pro Lys Val Glu Leu Arg Pro
1 5 10 15

Glu Tyr Arg Lys
20

<210> 292

5 <211> 6
<212> PRT
<213> *Prevotella intermedia*

<400> 292

Ser Phe Thr Pro Asp Ala
1 5
10

<210> 293

<211> 22

<212> PRT

15 <213> *Prevotella intermedia*

<400> 293

Thr Met Lys Glu Leu Val Asn Lys Pro Phe Ala Gln Phe Glu Thr Val
1 5 10 15

Val Leu Asn Asp Gly Val
20

20 <210> 294
<211> 20
<212> PRT
<213> *Prevotella intermedia*

25 <400> 294

Ser Ala Gly Asp Thr Met Lys Val Pro Lys Val Glu Leu Arg Pro Gln
1 5 10 15

Tyr Arg Thr Lys
20

<210> 295

<211> 6

30 <212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 295

His Phe Lys Pro Gly Lys
1 5

35 <210> 296
<211> 10

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

40 <400> 296

Glu Leu Arg Asp Arg Ala Asn Ile Tyr Gly
1 5 10

<210> 297
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*
 5
 <400> 297

Lys Tyr Val Pro His Phe Lys Pro Gly Lys Glu Leu Arg Asp Arg Ala
1 5 10 15

Asn Ile Tyr Gly
20

 10 <210> 298
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Salmonella enterica*

 15 <400> 298
His Phe Lys Pro Gly Lys
1 5

 <210> 299
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> *Salmonella enterica*

 <400> 299
Glu Leu Arg Asp Arg Ala Asn Ile Tyr Gly
1 5 10

 25 <210> 300
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Salmonella enterica*
 30 <400> 300
Lys Tyr Val Pro His Phe Lys Pro Gly Lys Glu Leu Arg Asp Arg Ala
1 5 10 15

Asn Ile Tyr Gly
20

 35 <210> 301
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Vibrio cholerae*

 <400> 301
His Phe Lys Pro Gly Lys
1 5
 40

 <210> 302
 <211> 8
 <212> PRT
 45 <213> *Vibrio cholerae*

 <400> 302

Glu Leu Arg Glu Arg Val Asn Leu
1 5

<210> 303

5 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Vibrio cholerae*

<400> 303
Glu Gly Lys Tyr Val Pro His Phe Lys Pro Gly Lys Glu Leu Arg Glu
1 5 10 15

Arg Val Asn Leu
20

10

<210> 304
 <211> 6
 <212> PRT
 15 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 304
His Phe Lys Pro Gly Lys
1 5

20 <210> 305
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

25 <400> 305
Glu Leu Arg Asp Arg Val Asn Glu Pro Glu
1 5 10

30 <210> 306
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 306
Lys Phe Val Pro His Phe Lys Pro Gly Lys Glu Leu Arg Asp Arg Val
1 5 10 15

Asn Glu Pro Glu
20

35

<210> 307
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

40 <400> 307
Tyr Phe Lys Ala Gly Lys
1 5

45 <210> 308
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Haemophilus influenzae*

<400> 308

Glu Leu Lys Ala Arg Val Asp Val Gln Ala
1 5 10

5

<210> 309

<211> 20

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae*

10

<400> 309

Lys Ser Val Pro Tyr Phe Lys Ala Gly Lys Glu Leu Lys Ala Arg Val
1 5 10 15

Asp Val Gln Ala
20

15

<210> 310

<211> 6

<212> PRT

<213> *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

<400> 310

Tyr Phe Lys Ala Gly Lys
1 5

20

<210> 311

<211> 11

<212> PRT

25

<213> *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

<400> 311

Glu Leu Arg Glu Arg Val Asp Val Tyr Ala Ala
1 5 10

30

<210> 312

<211> 20

<212> PRT

<213> *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

35

<400> 312

Cys Val Pro Tyr Phe Lys Ala Gly Lys Glu Leu Arg Glu Arg Val Asp
1 5 10 15

Val Tyr Ala Ala
20

40

<210> 313

<211> 6

<212> PRT

<213> *Neisseria gonorrhoeae*

<400> 313

His Phe Lys Pro Gly Lys
1 5

45

<210> 314

<211> 15
 <212> PRT
 <213> *Neisseria gonorrhoeae*
 5
 <400> 314
Glu Leu Arg Glu Arg Val Asp Leu Ala Leu Lys Glu Asn Ala Asn
1 5 10 15

 <210> 315
 10 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Neisseria gonorrhoeae*

 <400> 315
Phe Lys Pro Gly Lys Glu Leu Arg Glu Arg Val Asp Leu Ala Leu Lys
1 5 10 15

Glu Asn Ala Asn
20
 15

 <210> 316
 <211> 6
 <212> PRT
 20 <213> *Neisseria meningitidis*

 <400> 316
His Phe Lys Pro Gly Lys
1 5

 25 <210> 317
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*

 30 <400> 317
Glu Leu Arg Glu Arg Val Asp Leu Ala Leu Lys Glu Asn Ala Asn
1 5 10 15

 <210> 318
 <211> 20
 35 <212> PRT
 <213> *Neisseria meningitidis*

 <400> 318
Phe Lys Pro Gly Lys Glu Leu Arg Glu Arg Val Asp Leu Ala Leu Lys
1 5 10 15

Glu Asn Ala Asn
20
 40

 <210> 319
 <211> 6
 <212> PRT
 45 <213> *Burkholderia cenocepacia*

 <400> 319

His Phe Lys Pro Gly Lys
 1 5

5 <210> 320
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia cenocepacia*

<400> 320
Glu Leu Arg Glu Arg Val Asp Gly Arg Ala Gly Glu Pro Leu Lys Ala
 1 5 10 15

Asp Asp Pro Asp Asp Asp Arg
 20

10 <210> 321
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia cenocepacia*

15 <400> 321
Glu Arg Val Asp Gly Arg Ala Gly Glu Pro Leu Lys Ala Asp Asp Pro
 1 5 10 15

Asp Asp Asp Arg
 20

20 <210> 322
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia pseudomallei*

<400> 322
His Phe Lys Pro Gly Lys
 1 5

25 <210> 323
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia pseudomallei*

30 <400> 323
Glu Leu Arg Glu Arg Val Asp Gly Arg Ala Gly Glu Pro Leu Lys Asn
 1 5 10 15

Asp Glu Pro Glu Asp Ala Gln
 20

35 <210> 324
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Burkholderia pseudomallei*

40 <400> 324
Glu Arg Val Asp Gly Arg Ala Gly Glu Pro Leu Lys Asn Asp Glu Pro

	1	5	10	15
--	---	---	----	----

Glu Asp Ala Gln
20

5 <210> 325
<211> 6
<212> PRT
<213> *Bordetella pertussis*

<400> 325
His Phe Lys Ala Gly Lys
1 5

10 <210> 326
<211> 22
<212> PRT
<213> *Bordetella pertussis*

15 <400> 326
Glu Leu Arg Glu Trp Val Asp Leu Val Gly Asn Asp Gln Gly Asp Asp
1 5 10 15

Ser Ser Asn Gly Ser Ser
20

20 <210> 327
<211> 20
<212> PRT
<213> *Bordetella pertussis*

<400> 327
Asp Ser Ser Asn Gly Ser Ser Asp Pro Leu Gln Ser Val Met Asp Met
1 5 10 15

His Ala Met His
20

25 <210> 328
<211> 6
<212> PRT

30 <213> *Moraxella catarrhalis*

<400> 328
Tyr Phe Lys Pro Gly Lys
1 5

35 <210> 329
<211> 11
<212> PRT
<213> *Moraxella catarrhalis*

40 <400> 329
Ala Leu Arg Glu Ser Val Asn Leu Val Asn Asp
1 5 10

<210> 330
<211> 20

<212> PRT

<213> *Moraxella catarrhalis*

<400> 330

Ala Thr Pro Tyr Phe Lys Pro Gly Lys Ala Leu Arg Glu Ser Val Asn
1 5 10 15

Leu Val Asn Asp
20

5

<210> 331

<211> 6

<212> PRT

10 <213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 331

Tyr Phe Arg Pro Gly Lys
1 5

15

<210> 332

<211> 11

<212> PRT

<213> *Borrelia burgdorferi*

20

<400> 332

Asp Leu Lys Glu Arg Val Trp Gly Ile Lys Gly
1 5 10

<210> 333

<211> 20

25

<212> PRT

<213> *Borrelia burgdorferi*

<400> 333

His Val Ala Tyr Phe Arg Pro Gly Lys Asp Leu Lys Glu Arg Val Trp
1 5 10 15

Gly Ile Lys Gly
20

30

<210> 334

<211> 6

<212> PRT

35 <213> *Treponema denticola*

<400> 334

Arg Phe Lys Pro Gly Lys
1 5

40

<210> 335

<211> 17

<212> PRT

<213> *Treponema denticola*

45

<400> 335

Glu Leu Lys Glu Ala Leu His Lys Ile Asp Thr Gln Glu Leu Ile Glu
1 5 10 15

Ser

<210> 336
<211> 20
<212> PRT
<213> *Treponema denticola*

<400> 336
Pro Gly Lys Glu Leu Lys Glu Ala Leu His Lys Ile Asp Thr Gln Glu
1 5 10 15

Leu Ile Glu Ser
20

<210> 337
<211> 12
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<400> 337
Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly Glu Asp Ile Pro Ile
1 5 10

<210> 338
<211> 12
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<400> 338
Gly Arg Asn Pro Lys Thr Gly Asp Lys Val Glu Leu
1 5 10

<210> 339
<211> 12
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<400> 339
Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly Lys Glu Ile Lys Ile
1 5 10

<210> 340
<211> 12
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

<400> 340
Gly Arg Asn Pro Gln Thr Gly Lys Glu Ile Thr Ile
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un agente interferente que inhibe, compite o valora la unión de una proteína o polipéptido DNABII a un ADN microbiano para su uso en un método de inhibición, prevención o tratamiento de una infección microbiana que produce una biopelícula en un sujeto mediante inhibición, prevención o descomposición de la biopelícula microbiana, y en el que el agente interferente es uno o más de:

- (a) un polipéptido de factor de integración del hospedador (IHF) aislado o recombinante;
- (b) una proteína de tipo histona aislada o recombinante de un polipéptido de la cepa U93 de *E. coli* (HU);
- (c) un polipéptido aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 1 a 35, 37 a 340;
- (d) un polipéptido aislado o recombinante que comprende la región C-terminal que contiene al menos 10 aminoácidos C-terminales de un polipéptido de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, 42 a 100;
- (e) un polipéptido o polinucleótido que compite con un factor de integración del hospedador en la unión a un ADN microbiano;
- (f) un polipéptido DNABII aislado o recombinante;
- (g) un polipéptido de HU;
- (h) un polinucleótido de cruce de cuatro vías que se parece a una unión de Holliday o un polinucleótido de cruce de 3 vías que se parece a una horquilla de replicación;
- (i) un polinucleótido aislado o recombinante de la SEQ ID NO: 36;
- (j) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce o se une específicamente a uno cualquiera de (a) a (g);
- (k) una proteína del grupo de caja de alta movilidad (HMGB) 1 aislada o recombinante; o
- (l) una proteína o polipéptido aislado o recombinante que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con una proteína o polipéptido de uno cualquiera de (a) a (d), (f), (g) o (k), o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de (j).

2. El agente interferente para el uso de la reivindicación 1, en el que el uso es en combinación con uno o más de un antimicrobiano, una ADNasa, un anticuerpo, un péptido antigénico o un adyuvante.

3. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, o un polinucleótido aislado o recombinante que codifica dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, en el que el anticuerpo se selecciona opcionalmente entre el grupo de un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un derivado de anticuerpo, un anticuerpo remodelado superficialmente, un dianticuerpo, un derivado de anticuerpo, un anticuerpo humano recombinante, un anticuerpo quimérico, o un fragmento de anticuerpo para su uso en un método de inhibición, prevención o tratamiento de una infección microbiana que produce una biopelícula en un sujeto mediante la inhibición, competición o valoración de la unión de una proteína o polipéptido DNABII a un ADN microbiano, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno reconoce o se une específicamente a un polipéptido aislado o recombinante seleccionado entre el grupo:

- (a) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 1 a 5 o 12 a 27, 30 a 35, 101-340,
- (b) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 1 o 2,
- (c) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 3, 4 o 5,
- (d) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30 o 32,
- (e) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 31 o 33,
- (f) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 12 y 13,
- (g) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 14 y 15,
- (h) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 16 y 17,
- (i) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 18 y 19,
- (j) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 20 y 21,
- (k) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 23 y 24,
- (l) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 25 y 26,
- (m) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 30 y 31,
- (n) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 32 y 33,
- (o) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 34 y 35,
- (p) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 337 y 338,
- (q) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 339 y 340,
- (r) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 12 y 13,
- (s) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 14 y 15,
- (t) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 16 y 17,
- (u) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 18 y 19,
- (v) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 20 y 21,
- (w) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 23 y 24,
- (x) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 25 y 26,
- (y) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 30 y 31,
- (z) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 32 y 33,
- (aa) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 34 y 35,
- (bb) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 337 y 338,

(cc) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 339 y 340,

(dd) un polipéptido aislado o recombinante que comprende dos o más de los polipéptidos aislados o recombinantes de cualquiera de los anteriores,

5 (ee) un polipéptido aislado o recombinante que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con un polipéptido de uno cualquiera de (a) a (dd), con la condición para la totalidad de (a) a (ee) de que el polipéptido no sea ninguno de tipo natural de uno cualquiera de IHF alfa o IHF beta.

10 4. Una composición para su uso en un método de inhibición, prevención o tratamiento de una infección microbiana que produce una biopelícula en un sujeto mediante inhibición, competición o valoración de la unión de una proteína o polipéptido DNABII a un ADN microbiano que comprende un vehículo y un anticuerpo para el uso de la reivindicación 3;

y opcionalmente un adyuvante o un antimicrobiano,

15 y en la que el vehículo se selecciona entre el grupo de un vehículo líquido, un vehículo farmacéuticamente aceptable, un vehículo de fase sólida, un polímero farmacéuticamente aceptable, un liposoma, una micela, un implante, una endoprótesis vascular, una pasta, un gel, un implante dental o un implante médico;

y opcionalmente en la que la composición se formula para administración a un paciente humano, un paciente pediátrico o un animal no humano;

20 y opcionalmente en la que la composición se formula para administración mediante uno o más métodos que comprenden por vía local, tópica, transdérmica, transcutánea, sublingual, rectal, vaginal, ocular, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, uretral, intranasal, por inhalación o por vía oral, para su uso en un método de inhibición, prevención o tratamiento de una infección microbiana que produce una biopelícula en un sujeto mediante inhibición, competición o valoración de la unión de una proteína o polipéptido DNABII a un ADN microbiano.

25 5. Uso de un agente que inhibe, compite o valora la unión de una proteína o polipéptido DNABII a un ADN microbiano para un método *in vitro* o *ex vivo* para inhibir, prevenir o tratar una infección microbiana que produce una biopelícula en un sujeto mediante inhibición, prevención o descomposición de la biopelícula microbiana, en el que el agente es del grupo de:

(i) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno,

30 en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno reconoce o se une específicamente a un polipéptido aislado o recombinante seleccionado entre el grupo:

(a) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 1 a 5 o 12 a 27, 30 a 35, 101-340,

(b) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 1 o 2,

35 (c) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 3, 4 o 5,

(d) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30 o 32,

(e) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 31 o 33,

(f) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 12 y 13,

(g) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 14 y 15,

(h) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 16 y 17,

40 (i) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 18 y 19,

(j) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 20 y 21,

(k) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 23 y 24,

(l) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 25 y 26,

(m) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 30 y 31,

45 (n) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 32 y 33,

(o) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 34 y 35,

(p) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 337 y 338,

(q) un polipéptido que comprende las SEQ ID NOS: 339 y 340,

(r) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 12 y 13,

50 (s) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 14 y 15,

(t) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 16 y 17,

(u) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 18 y 19,

(v) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 20 y 21,

(w) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 23 y 24,

55 (x) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 25 y 26,

(y) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 30 y 31,

(z) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 32 y 33,

(aa) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 34 y 35,

(bb) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 337 y 338,

60 (cc) un polipéptido que consiste en las SEQ ID NOS: 339 y 340,

(dd) un polipéptido aislado o recombinante que comprende dos o más de los polipéptidos aislados o recombinantes de cualquiera de los anteriores,

(ee) un polipéptido aislado o recombinante que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con un polipéptido de uno cualquiera de (a) a (dd),

65 con la condición para la totalidad de (a) a (ee) de que el polipéptido no sea ninguno de tipo natural de uno cualquiera de IHF alfa o IHF beta;

(ii) una composición que comprende un vehículo y anticuerpo de parte (i); y opcionalmente un adyuvante o un antimicrobiano,

y en el que el vehículo se selecciona entre el grupo de un vehículo líquido, un vehículo farmacéuticamente aceptable, un vehículo de fase sólida, un polímero farmacéuticamente aceptable, un liposoma, una micela, un implante, una endoprótesis vascular, una pasta, un gel, un implante dental o un implante médico;

(iii) un polipéptido de factor de integración del hospedador (IHF) aislado o recombinante;

(iv) una proteína de tipo histona aislada o recombinante de un polipéptido de la cepa U93 de *E. coli* (HU);

(v) un polipéptido aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 1 a 35, 37 a 340;

(vi) un polipéptido aislado o recombinante que comprende la región C-terminal que contiene al menos 10 aminoácidos C-terminales de un polipéptido de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, 42 a 100;

(vii) un polipéptido que compite con un factor de integración del hospedador en la unión a un ADN microbiano;

(viii) un polinucleótido de cruce de cuatro vías que se parece a una unión de Holliday o un polinucleótido de cruce de 3 vías que se parece a una horquilla de replicación;

(ix) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce o se une específicamente a uno cualquiera de (iii) a (vii);

(x) una proteína o polipéptido aislado o recombinante que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con una proteína o polipéptido de uno cualquiera de (iii) a (vii), o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de (i).

6. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 3:

(a) en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal;

(b) en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo remodelado superficialmente, un anticuerpo modificado o un derivado de anticuerpo;

(c) en el que el anticuerpo se modifica mediante mutaciones conservativas de aminoácidos en las regiones CDR 1, CDR 2 y/o CDR 3 de VH y/o VL;

(d) en el que el anticuerpo se modifica mediante alteración del número de restos de cisteína o mediante mutaciones conservativas de aminoácidos en la región bisagra Fc;

(e) en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que está químicamente modificado, pegilado, o conjugado a proteína sérica;

(f) en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que está conjugado o fusionado a al menos una molécula funcional adicional; preferentemente, en el que la molécula funcional adicional es un segundo anticuerpo;

(g) en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que está conjugado a un agente de diagnóstico.

7. Un método implementado por computadora para identificar un agente que inhibe, compite o valora la unión de una proteína o polipéptido DNABII a un ADN microbiano para su uso en la inhibición, prevención o descomposición de una biopelícula microbiana, comprendiendo el método posicionar una estructura tridimensional de un agente candidato frente a una estructura tridimensional de una proteína de factor de integración del hospedador (IHF), en el que la estructura tridimensional de la proteína de IHF se basa en coordenadas de estructura atómica X, Y y Z determinadas a partir de una forma cristalina de un complejo de IHF y ADN, en el que la interacción del agente con el IHF en dos o más aminoácidos de IHF seleccionados entre T4, K5, A6, E28, Q43, K45, S47, G48, N51, R55, K57, R60, R63, N64, P65, K66, R76, T80, R82 o Q85 como se representa en la SEQ ID NO: 42 identifica que el agente inhibe, compite o valora la unión de un polipéptido o proteína DNABII a un ADN microbiano, inhibe, previene o descompone una biopelícula microbiana, inhibe, previene o descompone una biopelícula, o inhibe, previene o trata una infección microbiana que produce una biopelícula.

8. El método implementado por computadora de la reivindicación 7, en el que la interacción del agente con el IHF en tres o más aminoácidos de IHF seleccionados entre T4, K5, A6, E28, Q43, K45, S47, G48, N51, R55, K57, R60, R63, N64, P65, K66, R76, T80, R82 o Q85 como se representa en la SEQ ID NO: 42 identifica que el agente inhibe, compite o valora la unión de un polipéptido o proteína DNABII a un ADN microbiano, inhibe, previene o descompone una biopelícula microbiana, inhibe, previene o descompone una biopelícula, o inhibe, previene o trata una infección microbiana que produce una biopelícula.

9. El método implementado por computadora de la reivindicación 7 u 8 en el que las coordenadas de estructura atómica X, Y y Z comprenden las coordenadas que se exponen en el N.º de Acceso de Protein Data Bank (PDB): 1IHF y en el que el agente no es la SEQ ID NO: 6, 8, 9 o 46; preferentemente en el que las coordenadas de estructura atómica X, Y y Z comprenden las coordenadas que se exponen en el N.º de Acceso de Protein Data Bank (PDB): 1IHF y en el que el agente es uno o más de:

(a) un polipéptido de factor de integración del hospedador (IHF) aislado o recombinante;

(b) una proteína de tipo histona aislada o recombinante de un polipéptido de la cepa U93 de *E. coli* (HU);

(c) un polipéptido aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 1 a 35, 37 a 340;

(d) un polipéptido aislado o recombinante que comprende la región C-terminal que contiene al menos 10 aminoácidos C-terminales de un polipéptido de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, 42 a 100;

(e) un polipéptido o polinucleótido que compite con un factor de integración del hospedador en la unión a un ADN microbiano;

(f) un polipéptido DNABII aislado o recombinante;

- (g) un polipéptido de HU;
- (h) un polinucleótido de cruce de cuatro vías que se parece a una unión de Holliday o un polinucleótido de cruce de 3 vías que se parece a una horquilla de replicación;
- (i) un polinucleótido aislado o recombinante de la SEQ ID NO: 36;
- (j) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce o se une específicamente a uno cualquiera de (a) a (g);
- (k) una proteína del grupo de caja de alta movilidad (HMGB) 1 aislada o recombinante; o
- (l) una proteína o polipéptido aislado o recombinante que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con una proteína o polipéptido de uno cualquiera de (a) a (g) o (k), o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de (j).

10. Un aparato de computación a medida que comprende:

- al menos un procesador;
- una memoria acoplada a al menos un procesador;

un medio de almacenamiento en comunicación con la memoria y el al menos un procesador, conteniendo el medio de almacenamiento un conjunto de instrucciones ejecutables por procesador que, cuando se ejecutan por el procesador configuran el aparato de computación a medida para identificar un agente que inhibe, compite o valora la unión de un polipéptido o proteína DNABII a un ADN microbiano, que inhibe, previene o descompone una biopelícula microbiana, que inhibe, previene o descompone una biopelícula en un sujeto, o que inhibe, previene o trata una infección microbiana que produce una biopelícula en un sujeto, en el que la configuración comprende:

posicionar una estructura tridimensional de un agente candidato frente a una estructura tridimensional de una proteína de factor de integración del hospedador (IHF), en el que la estructura tridimensional de la proteína de IHF se basa en coordenadas de estructura atómica X, Y y Z determinadas a partir de una forma cristalina de un complejo de IHF y ADN, en el que la interacción del agente con el IHF en dos o más aminoácidos de IHF seleccionados entre T4, K5, A6, E28, Q43, K45, S47, G48, N51, R55, K57, R60, R63, N64, P65, K66, R76, T80, R82 o Q85 como se representa en la SEQ ID NO: 42 identifica que el agente inhibe, compite o valora la unión de un polipéptido o proteína DNABII a un ADN microbiano, inhibe, previene o descompone una biopelícula microbiana, inhibe, previene o descompone una biopelícula, o inhibe, previene o trata una infección microbiana que produce una biopelícula.

11. Un método *in vitro* para determinar si es probable que un paciente se trate mediante la administración de un agente interferente que inhibe, previene o descompone una biopelícula microbiana mediante inhibición, competición o valoración de la unión de una proteína o polipéptido DNABII a un ADN microbiano, comprendiendo el método detectar la presencia o ausencia de un polipéptido o proteína DNABII en una muestra aislada de un paciente que contiene una infección microbiana que es probable o no es probable que se trate mediante la administración de un agente interferente, en el que la presencia del polipéptido o proteína DNABII identifica el paciente como probable para que se trate mediante la administración del agente interferente y la ausencia de un polipéptido o proteína DNABII identifica el paciente como no probable para que se trate mediante la administración del agente interferente, y en el que el agente interferente es uno o más de:

- (a) un polipéptido de factor de integración del hospedador (IHF) aislado o recombinante;
- (b) una proteína de tipo histona aislada o recombinante de un polipéptido de la cepa U93 de *E. coli* (HU);
- (c) un polipéptido aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 1 a 35, 36 a 340;
- (d) un polipéptido aislado o recombinante que comprende la región C-terminal que contiene al menos 10 aminoácidos C-terminales de un polipéptido de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, 42 a 100;
- (e) un polipéptido o polinucleótido que compite con un factor de integración del hospedador en la unión a un ADN microbiano;
- (f) un polipéptido DNABII aislado o recombinante;
- (g) un polipéptido de HU;
- (h) un polinucleótido de cruce de cuatro vías que se parece a una unión de Holliday o un polinucleótido de cruce de 3 vías que se parece a una horquilla de replicación;
- (i) un polinucleótido aislado o recombinante de la SEQ ID NO: 36;
- (j) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce o se une específicamente a uno cualquiera de (a) a (g);
- (k) una proteína del grupo de caja de alta movilidad (HMGB) 1 aislada o recombinante; o
- (l) una proteína o polipéptido aislado o recombinante que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con una proteína o polipéptido de uno cualquiera de (a) a (g) o (k), o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de (j).

12. La composición para el uso de la reivindicación 4 que comprende además uno o más de un antimicrobiano, una ADNasa, un anticuerpo, un péptido antigénico o un adyuvante.

13. Un kit para su uso en un método de inhibición, prevención o tratamiento de una infección microbiana que produce una biopelícula en un sujeto o descomposición de una biopelícula en un sujeto mediante inhibición, prevención o descomposición de una biopelícula microbiana en un sujeto, comprendiendo el kit un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para el uso de la reivindicación 3 o la composición para el uso de la reivindicación 4 e instrucciones para su uso en la descomposición de una biopelícula o la inhibición, prevención o tratamiento de una infección microbiana que produce una biopelícula mediante inhibición, competición o valoración de la unión de una

proteína o polipéptido DNABII a un ADN microbiano.

14. Un método *in vitro* o *ex vivo* de inhibición, prevención o descomposición de una biopelícula microbiana que usa un agente interferente que inhibe, compite o valora la unión de una proteína o polipéptido DNABII a un ADN microbiano, en el que el agente interferente es uno o más de:
- (a) un factor de integración del hospedador (IHF) aislado o recombinante;
 - (b) una proteína de tipo histona aislada o recombinante de un polipéptido de la cepa U93 de *E. coli* (HU);
 - (c) un polipéptido aislado o recombinante de las SEQ ID NOS: 1 a 35 y 37 a 340;
 - (d) un polipéptido aislado o recombinante que comprende la región C-terminal que contiene al menos 10 aminoácidos C-terminales de un polipéptido de las SEQ ID NOS: 6 a 11, 28, 29, 42 a 100;
 - (e) un polipéptido o polinucleótido que compite con un factor de integración del hospedador en la unión a un ADN microbiano;
 - (f) un polipéptido DNABII aislado o recombinante;
 - (g) un polipéptido de HU;
 - (h) un polinucleótido de cruce de cuatro vías que se parece a una unión de Holliday o un polinucleótido de cruce de 3 vías que se parece a una horquilla de replicación;
 - (i) un polinucleótido aislado o recombinante de la SEQ ID NO: 36;
 - (j) un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce o se une específicamente a uno cualquiera de (a) a (g);
 - (k) una proteína del grupo de caja de alta movilidad (HMGB) 1 aislada o recombinante; o
 - (l) una proteína o polipéptido aislado o recombinante que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con una proteína o polipéptido de uno cualquiera de (a) a (g) o (k), o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de (j).

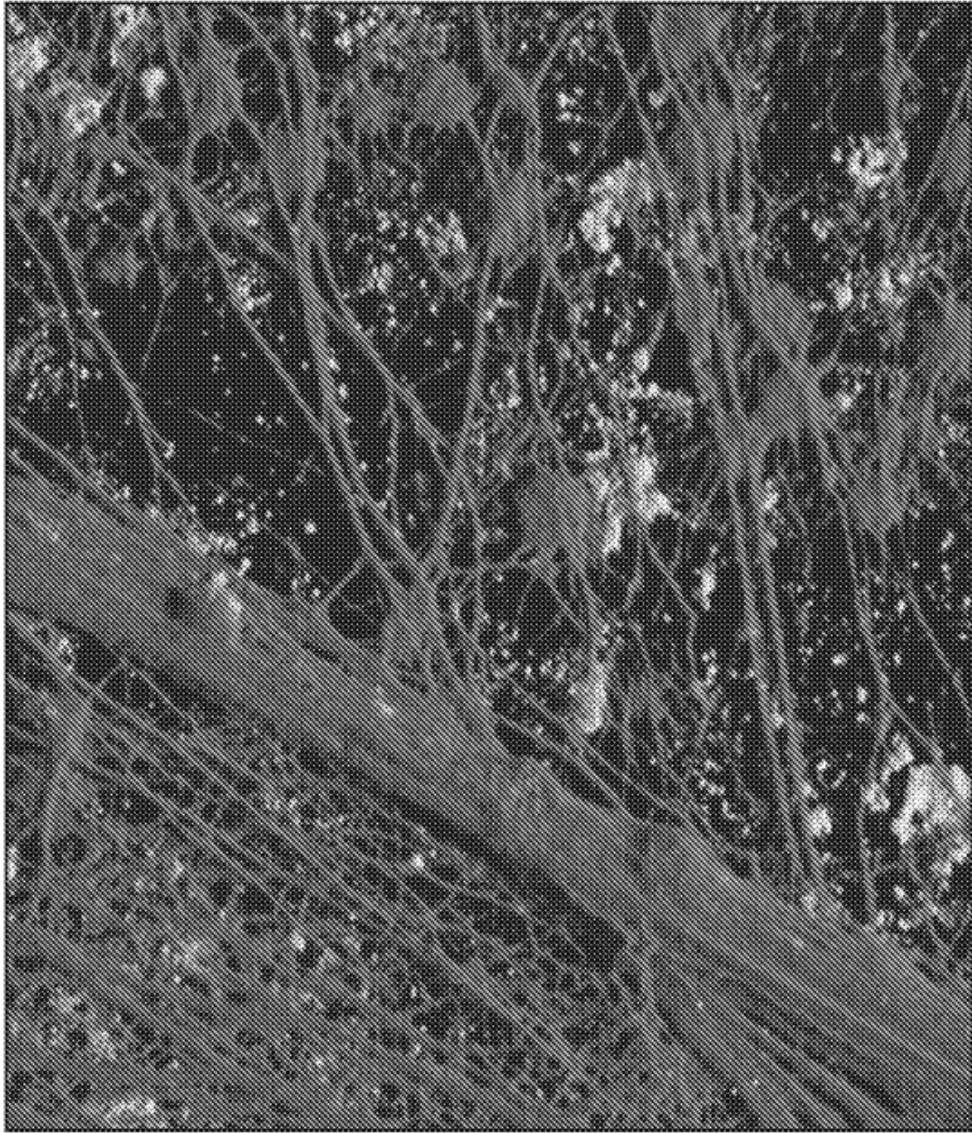


FIG. 1A

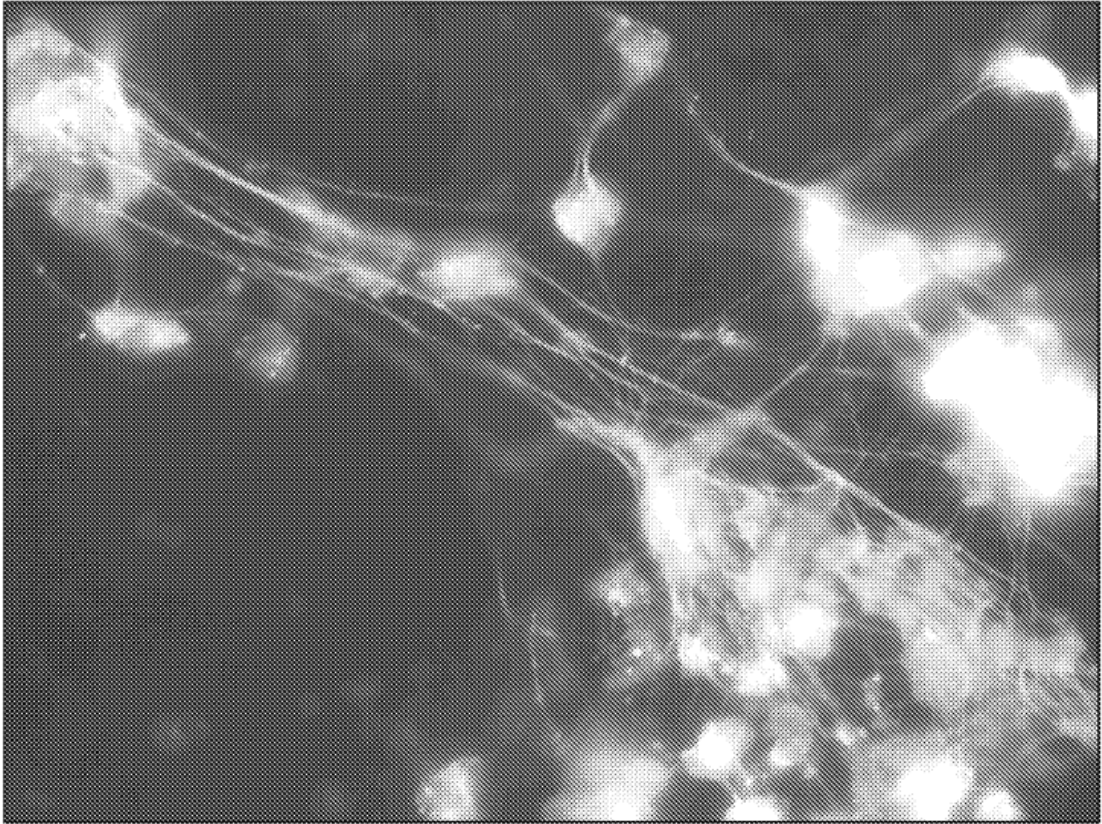


FIG. 1B

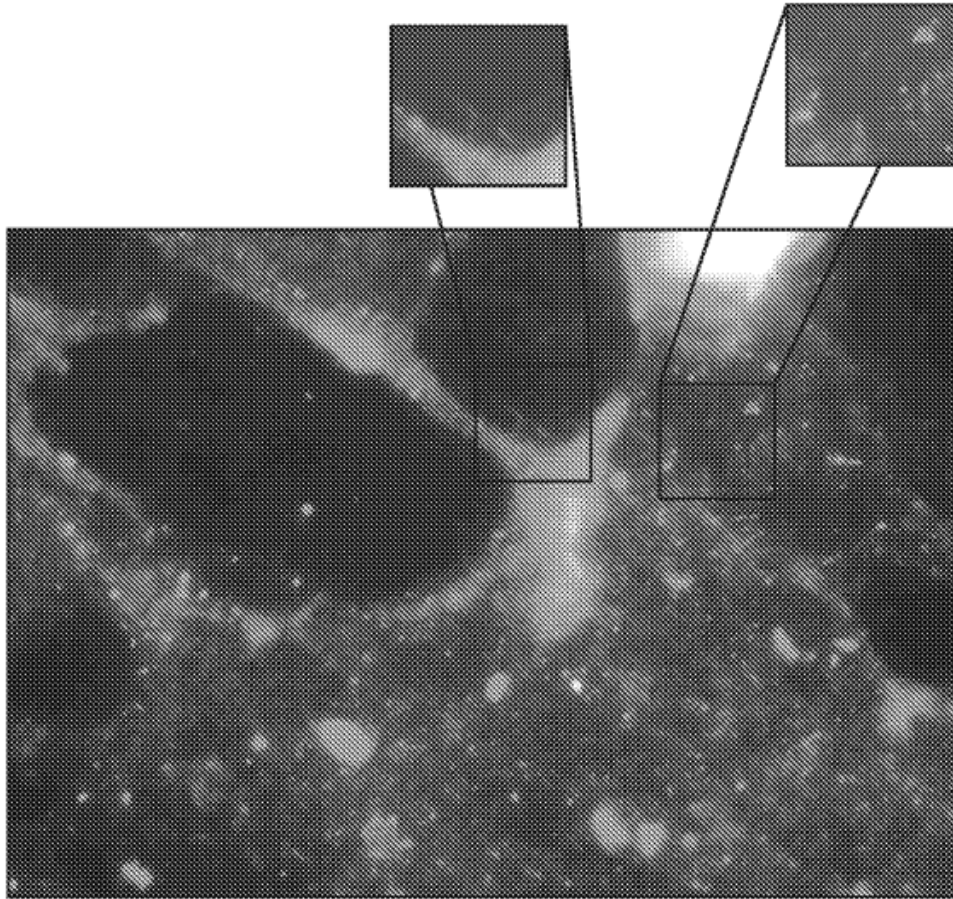


FIG. 1C

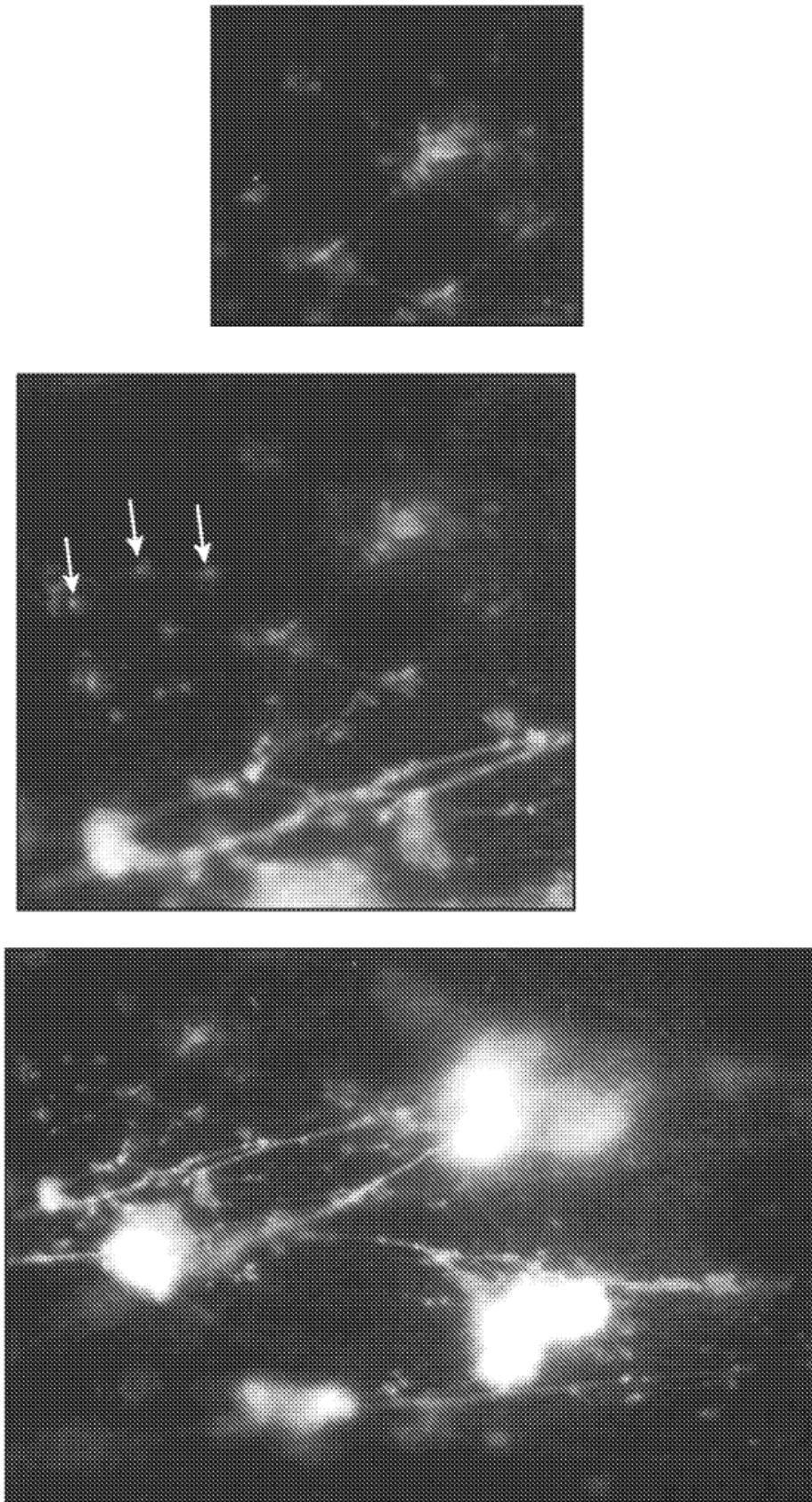
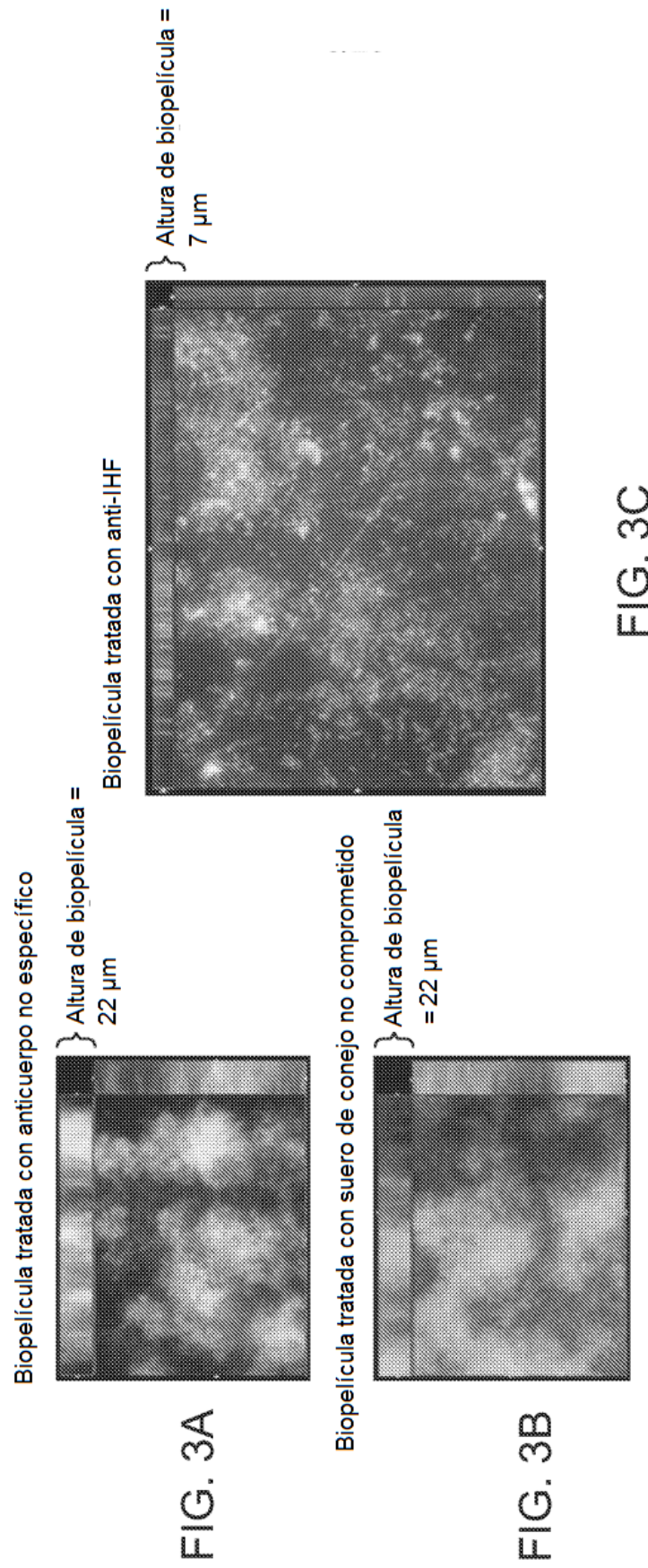
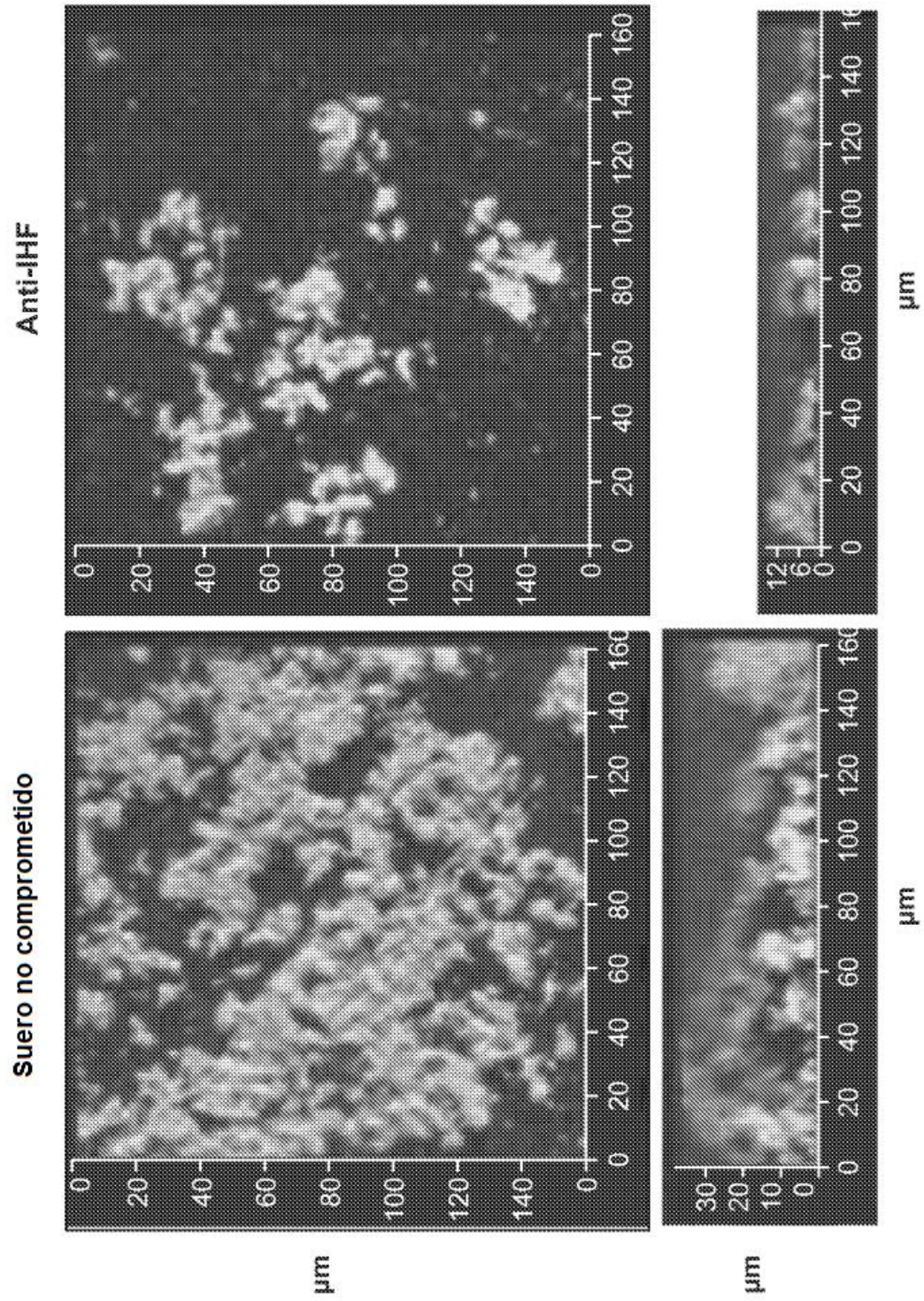


FIG. 2





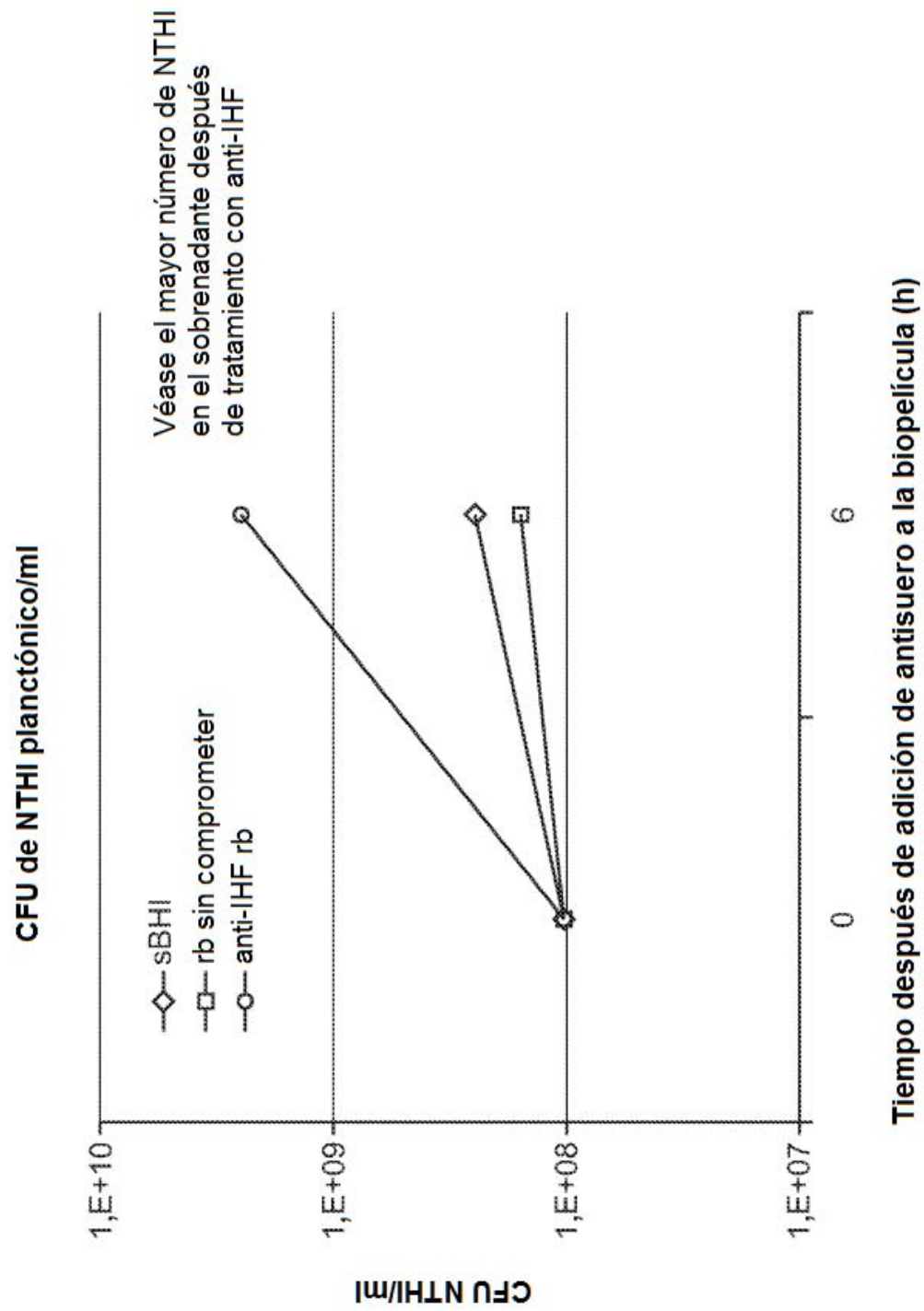


FIG. 4A

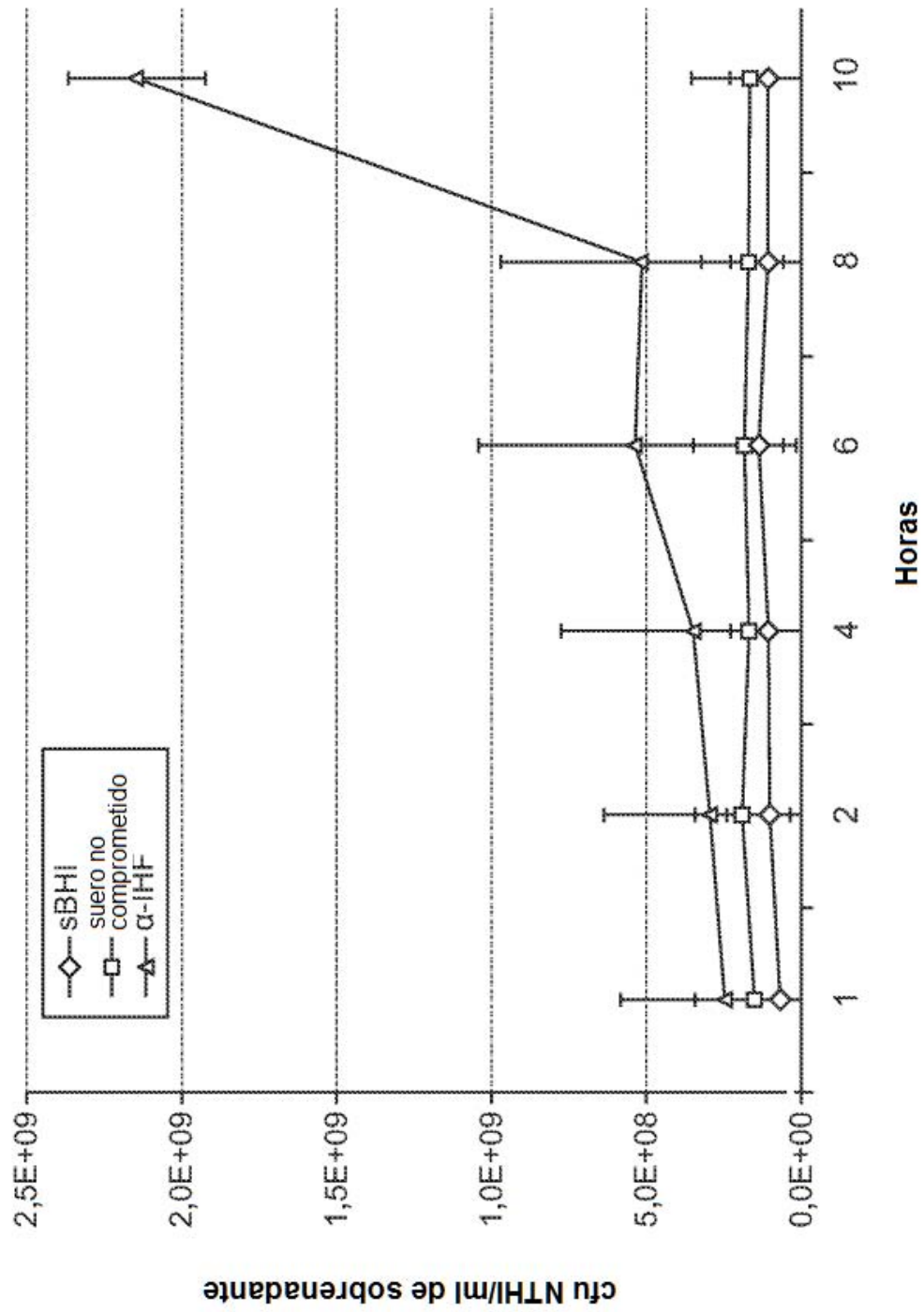


FIG. 4B

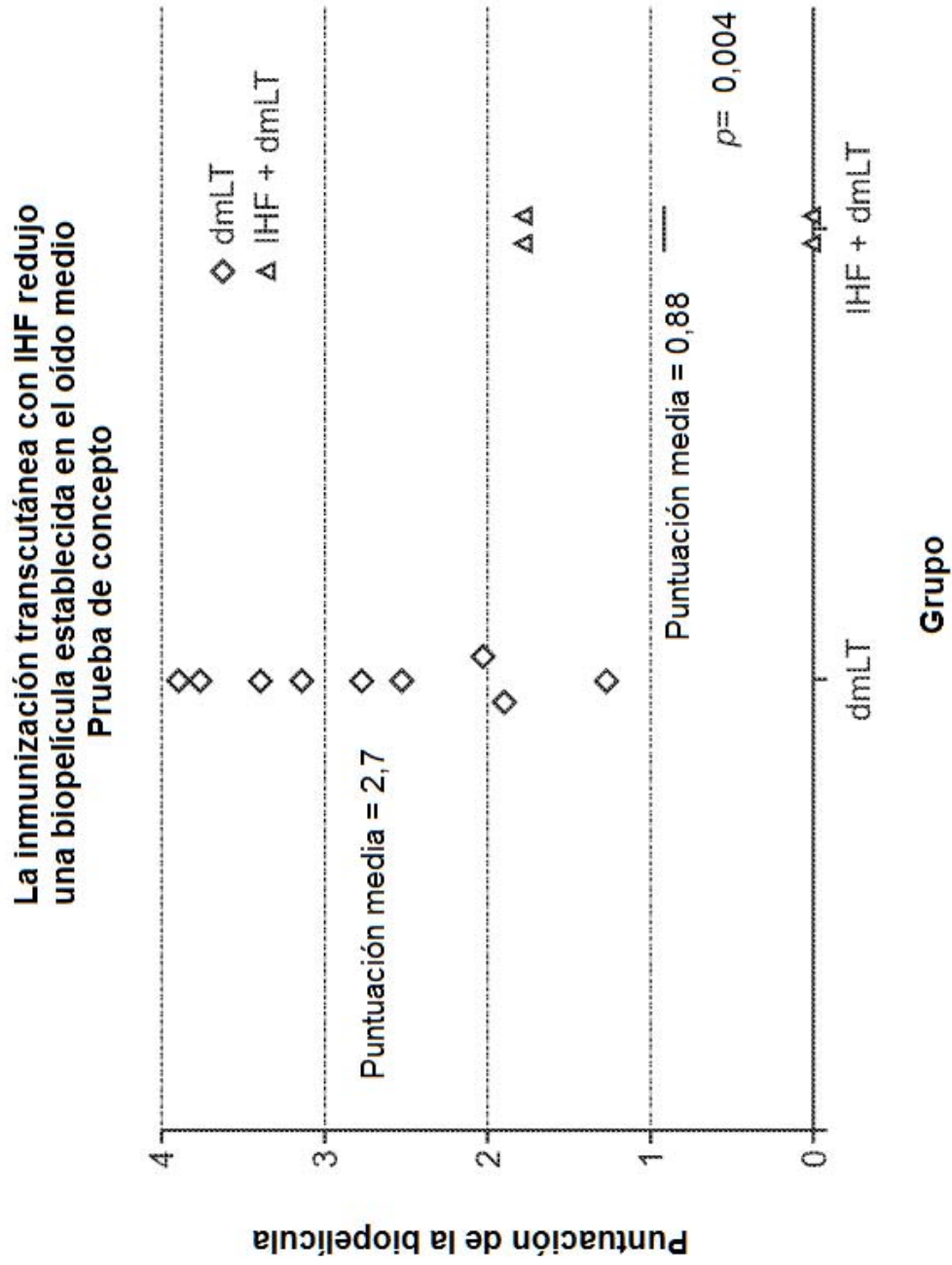


FIG. 5

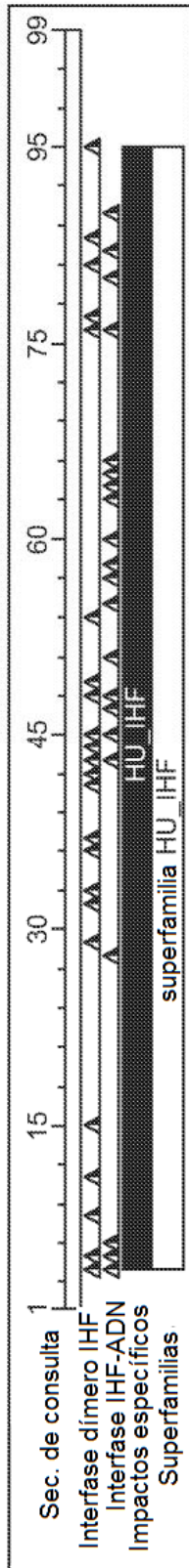


FIG. 6A

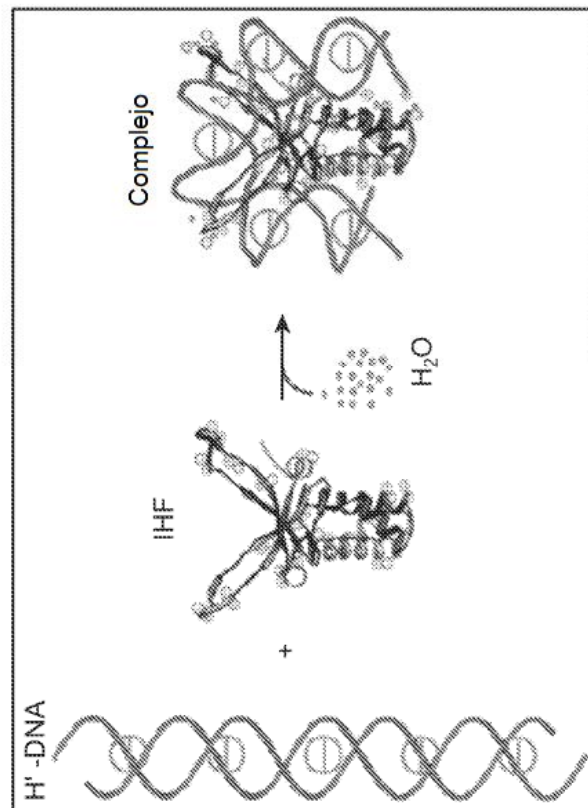


FIG. 6B

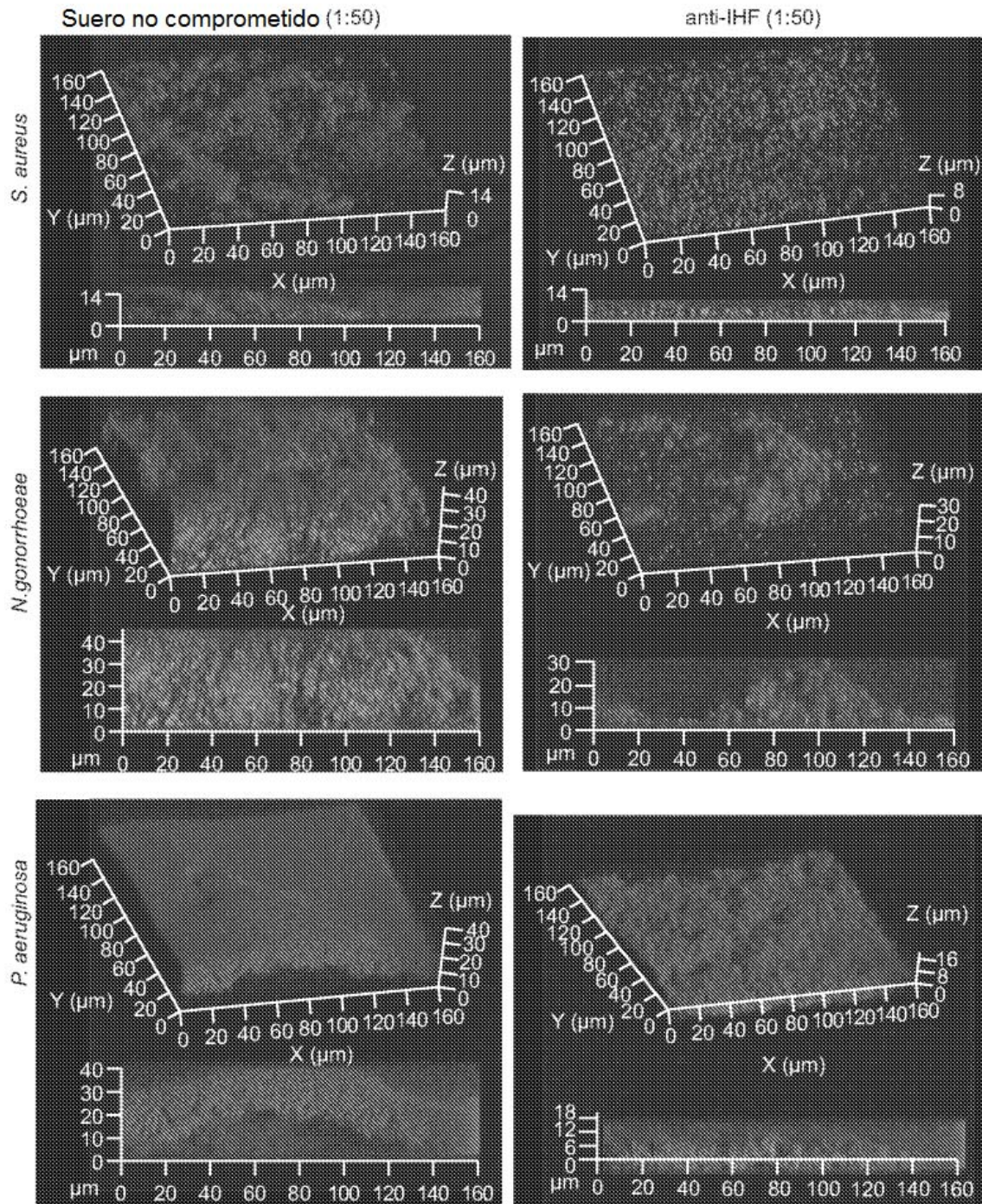
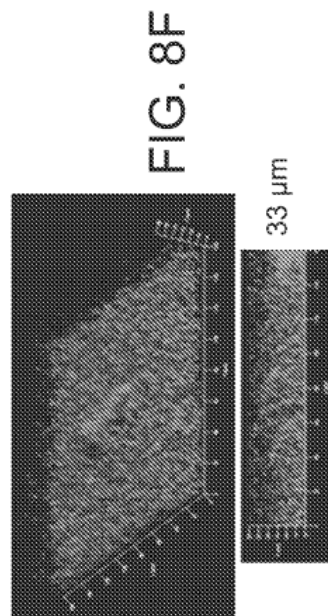
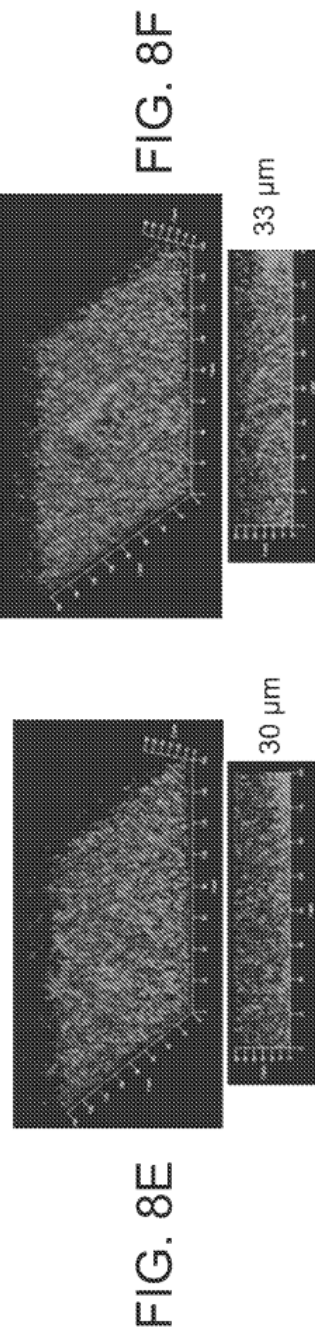
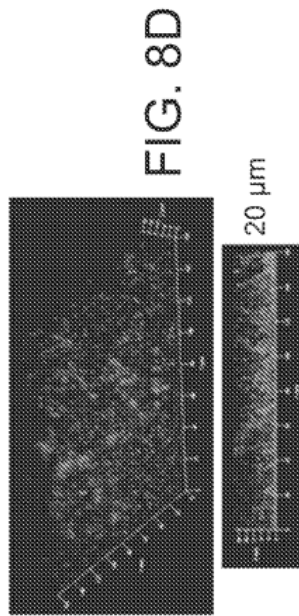
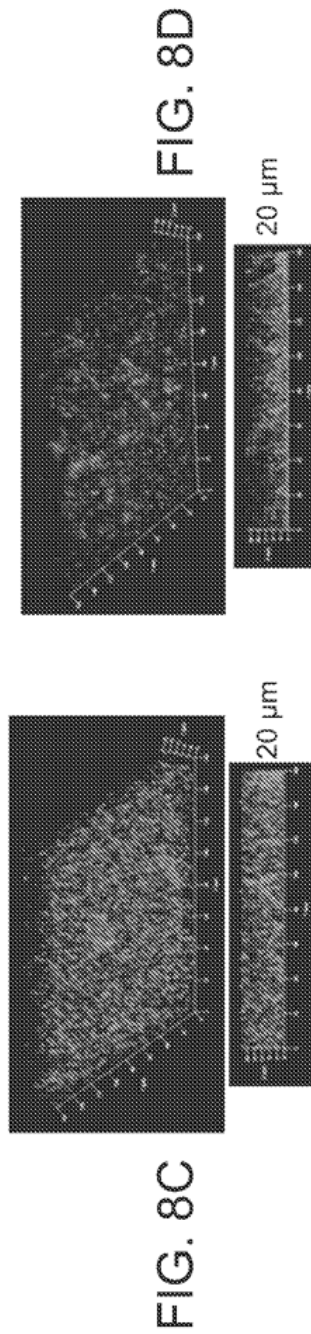
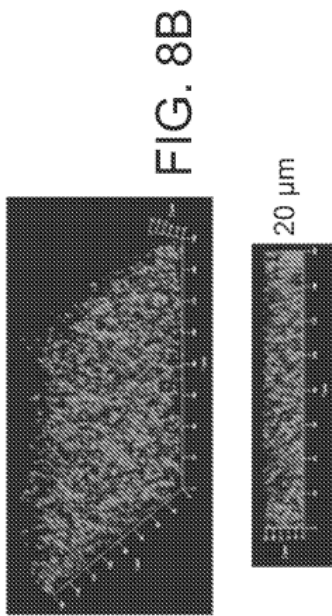
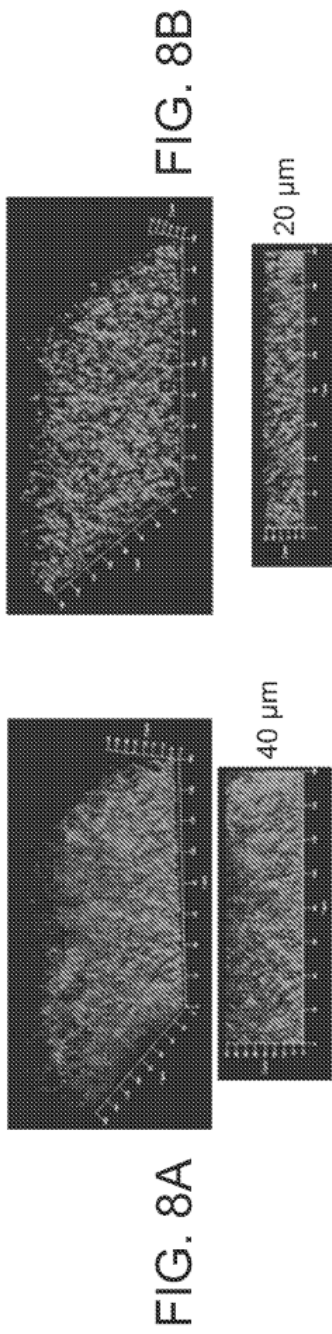


FIG. 7



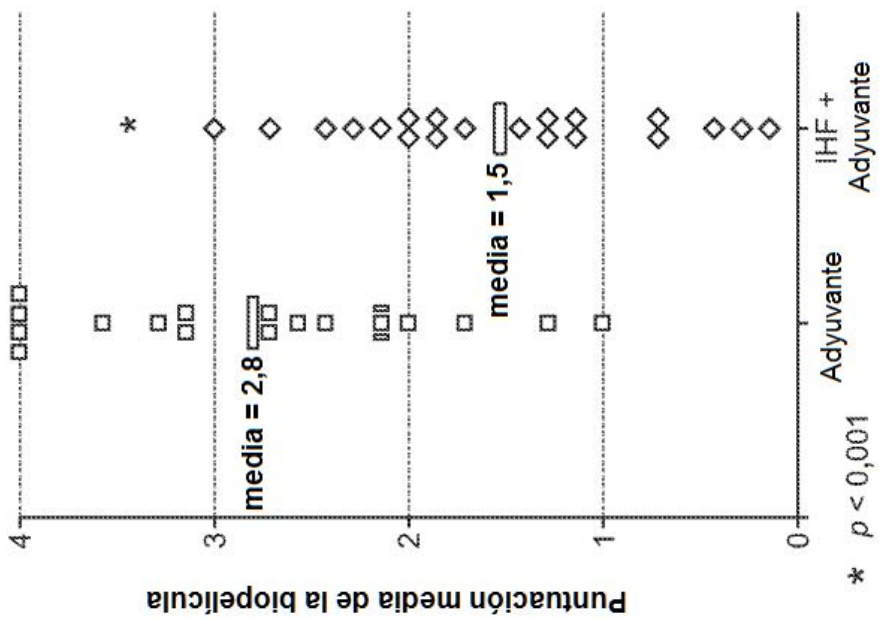


FIG. 9A

Imágenes representativas de cada cohorte

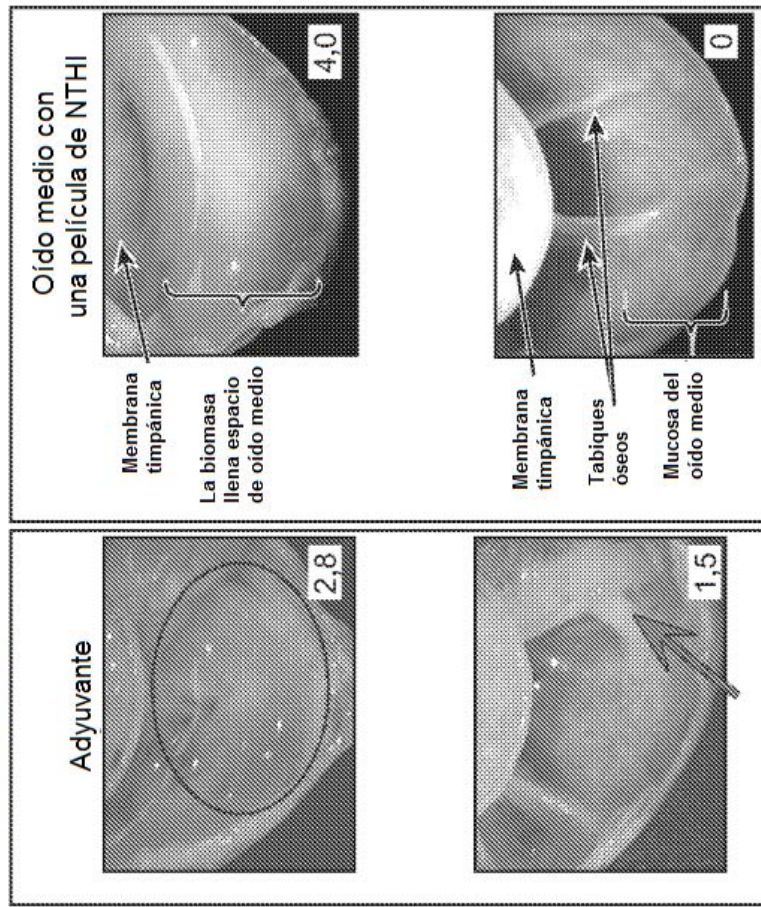


FIG. 9B

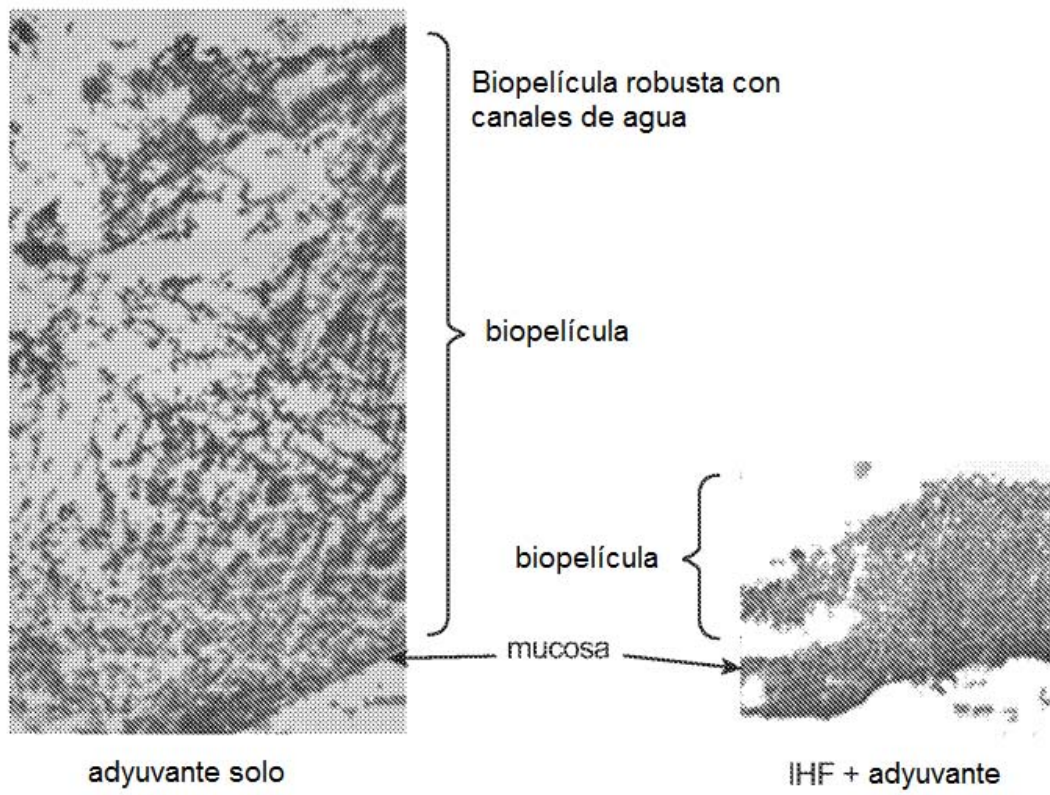


FIG. 10A

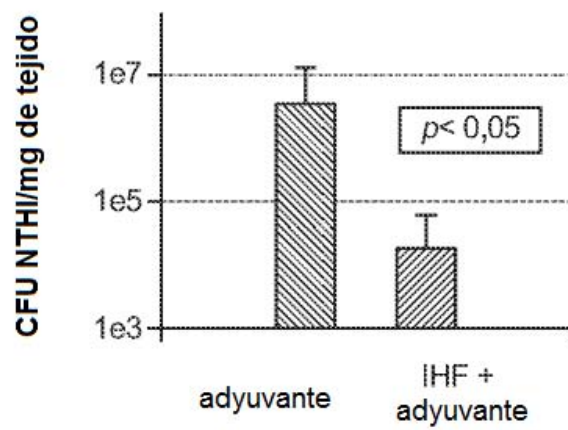


FIG. 10B

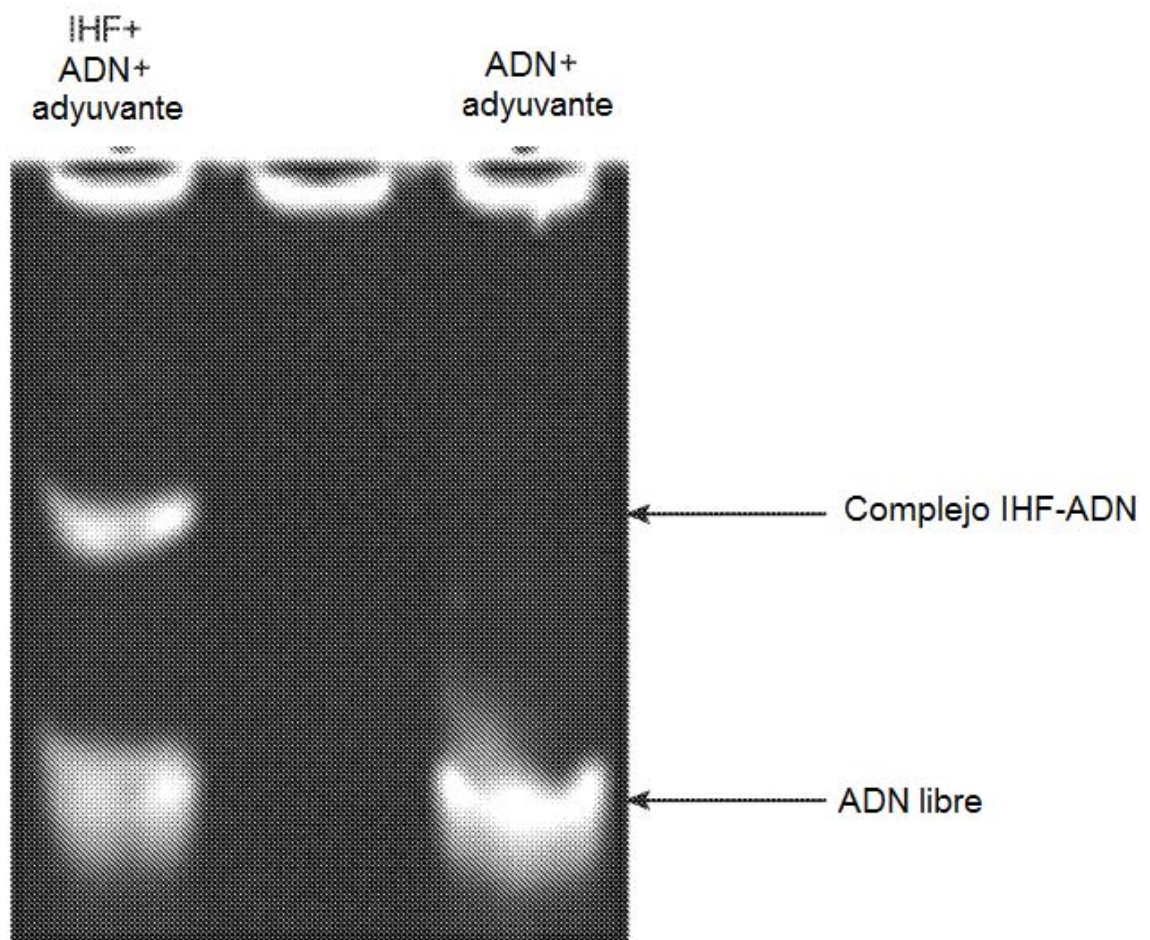


FIG. 11

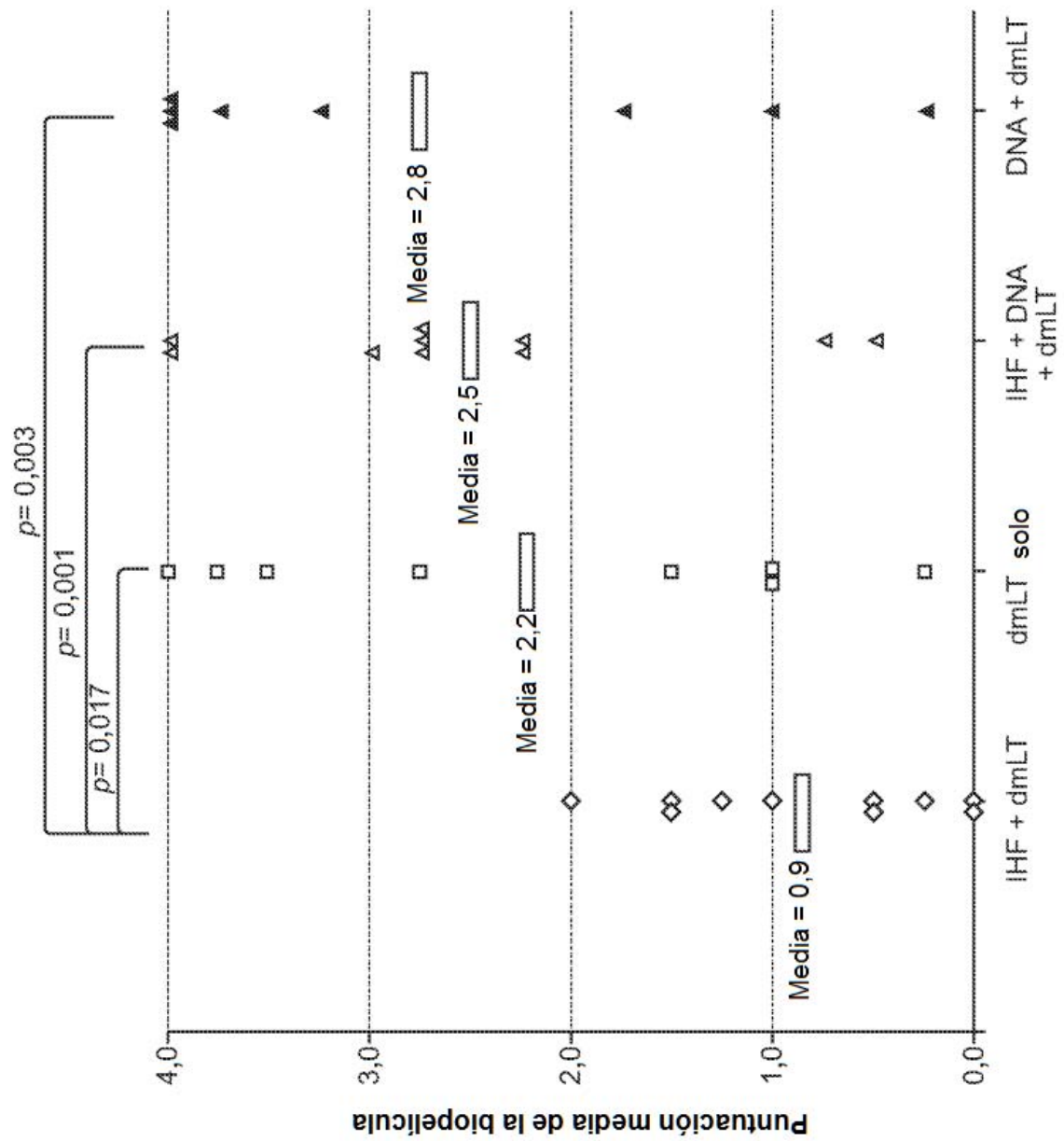


FIG. 12

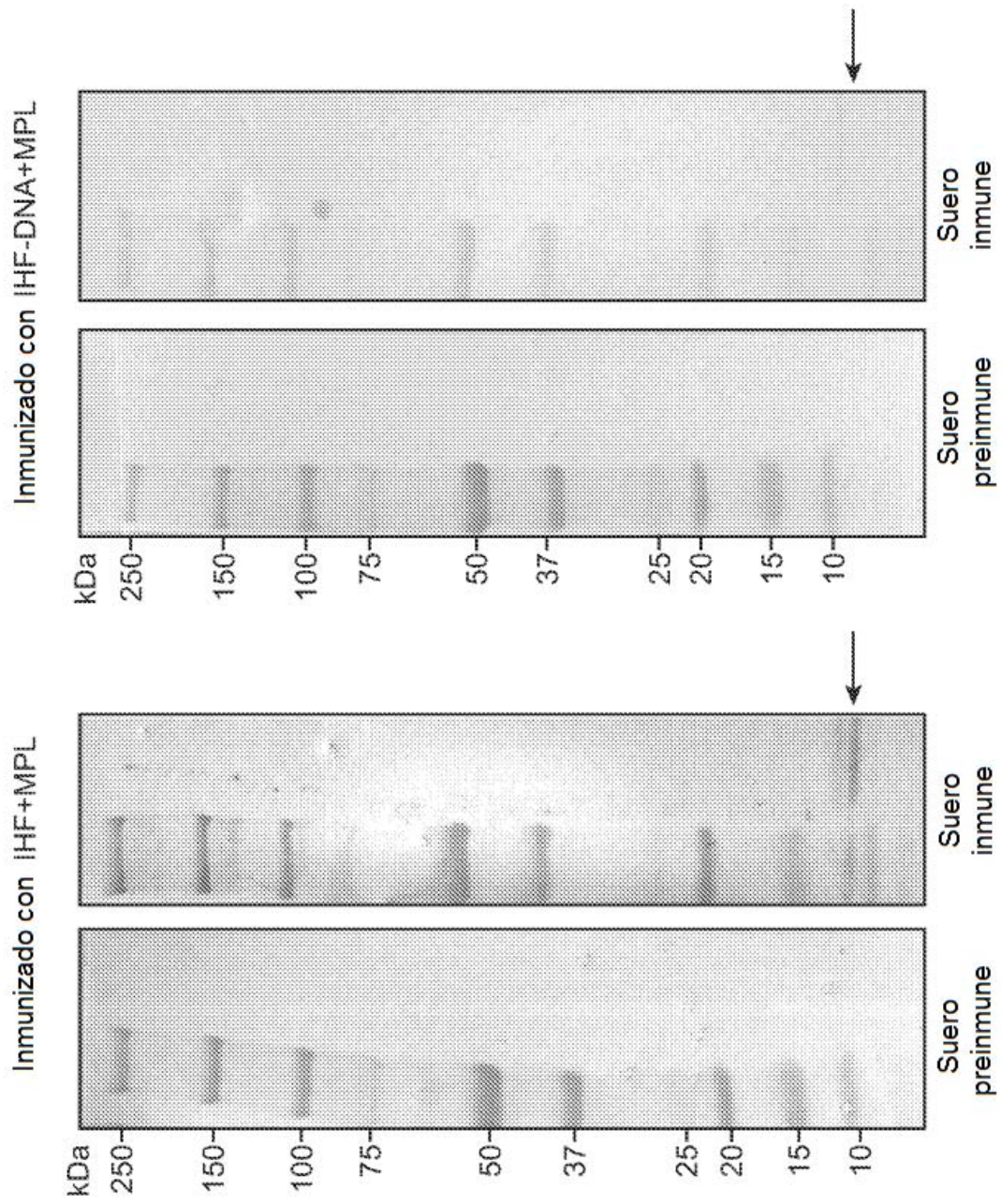


FIG. 13

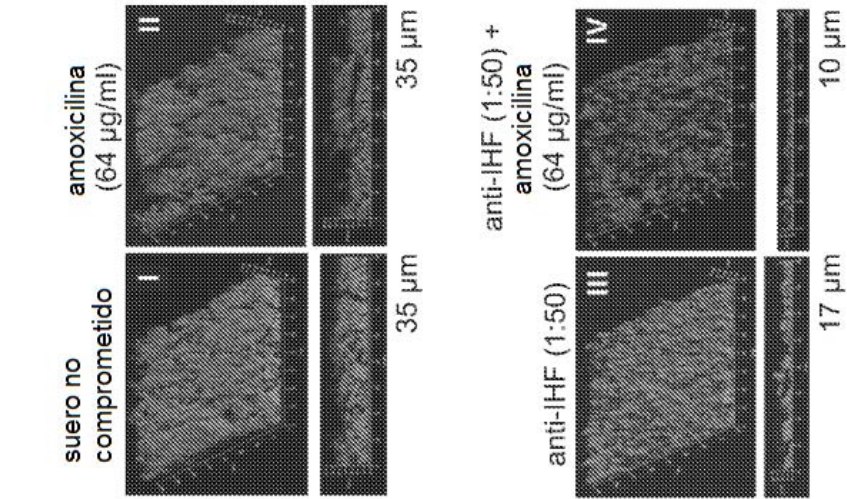


FIG. 14A

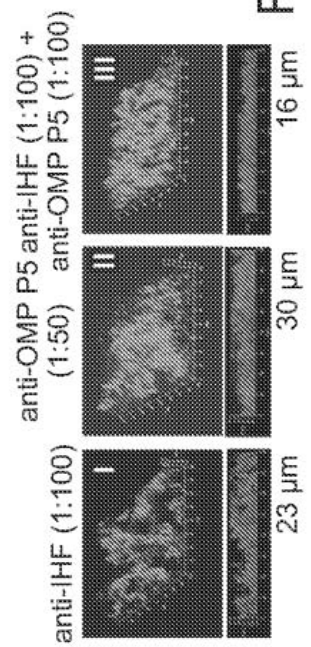


FIG. 14B

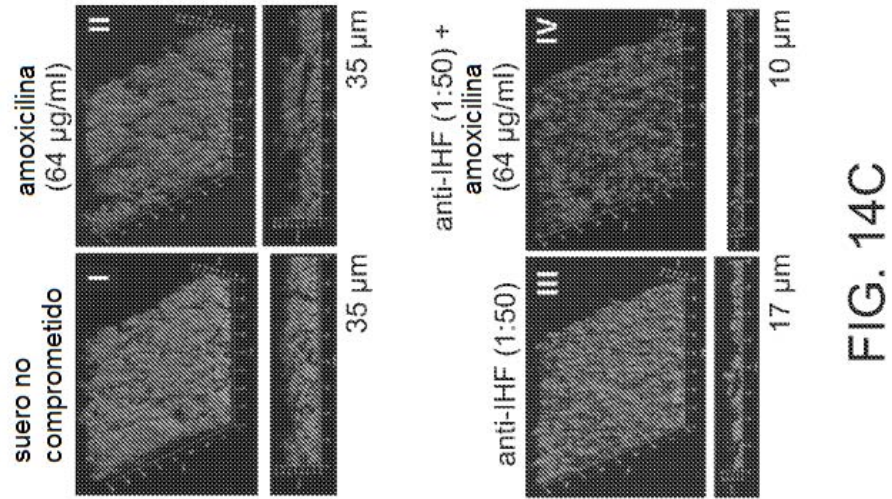


FIG. 14C

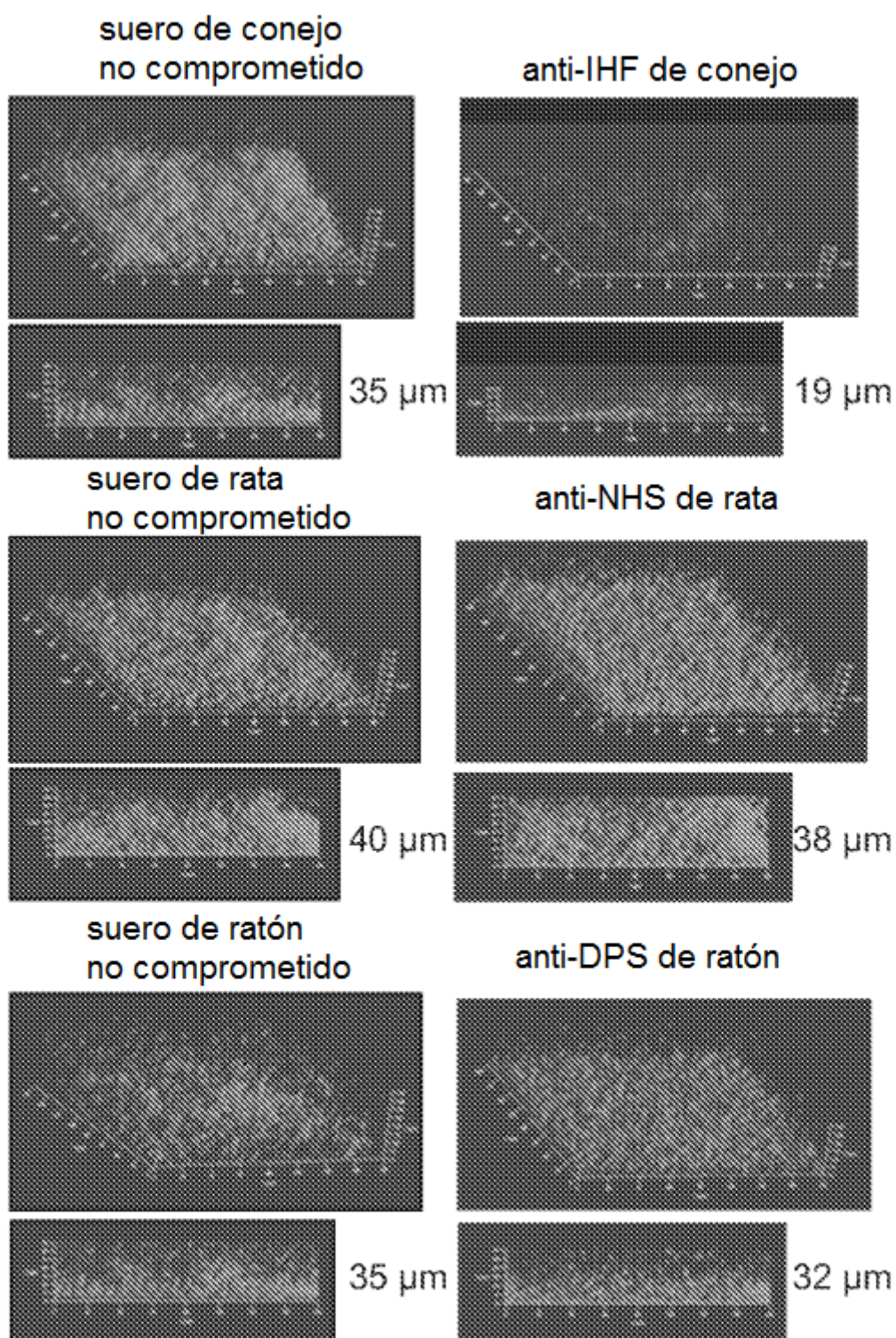


FIG. 15

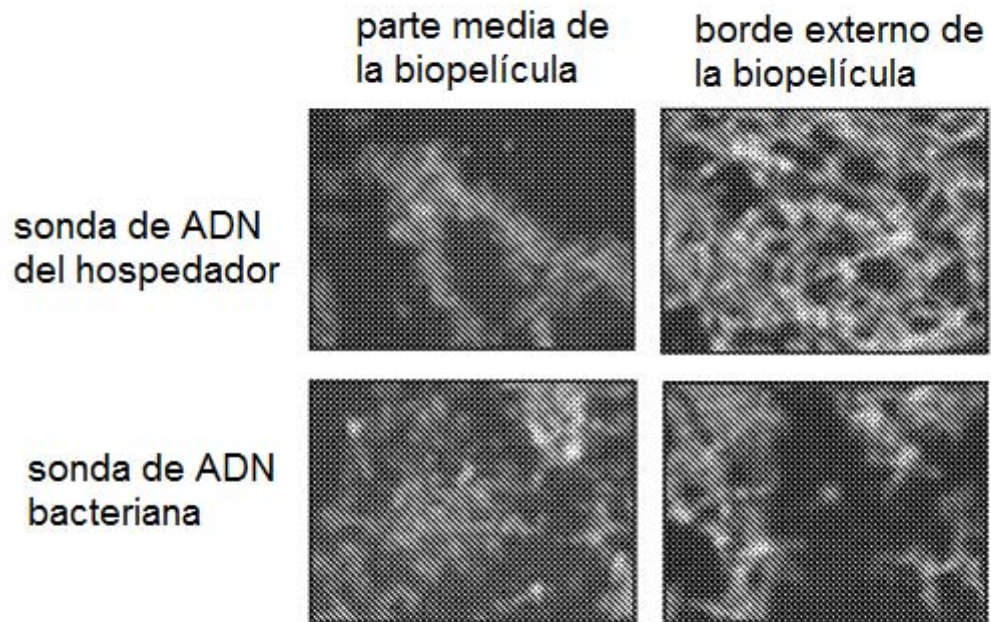


FIG. 16