

1.F.
B.T.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N° 06-113634

54. TÍTULO "PEPTIDOS TERAPEUTICOS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K38/16//A61K38/04//A61K38/17
A61P31/04.

71. SOLICITANTE THE UNIVERSITY OF BRISTOL

DOMICILIO REINO UNIDO

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 6 NOV 2006

SS

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
 REG: 05-113634-00000-0000
 REG: 2005-11-05 RESOLV. DIR. 2005 NUCHEAUKUNES
 DIR. 11 PATENTISTA
 ENE: 2/05 FASE NACIONAL

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

15- Nov -06

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: THE UNIVERSITY OF BRISTOL

Dirección: Senate House, Tyndall Avenue,
 Bristol BS8 1TH, Reino Unido.

Nacionalidad o Domicilio: Reino Unido.

Lugar de Constitución:

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
 C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
 Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
 C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: VIRJI, Mumtaz.

Dirección: Department of Pathology and Microbiology, School of Medical
 Sciences, University of Bristol, University Walk, Bristol BS8 1TD.

Nacionalidad o Domicilio: Reino Unido.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2005/001465

Fecha: 15/04/05

Publicación Internacional No. WO 2005/099337 A2

Fecha: 27/10/05

⑥

Título (54)

"PÉPTIDOS TERAPÉUTICOS"

⑦

Clasificación Internacional (51)

A61K3816 // A61K38/04. // A61K38/17
A61P31/04

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

GB
 GB

15/04/04
 03/09/04

0408390.3
 0419594.7

⑨

Comprobante de Pago No. 06-78.905

Fecha: 11 de Octubre de 2006

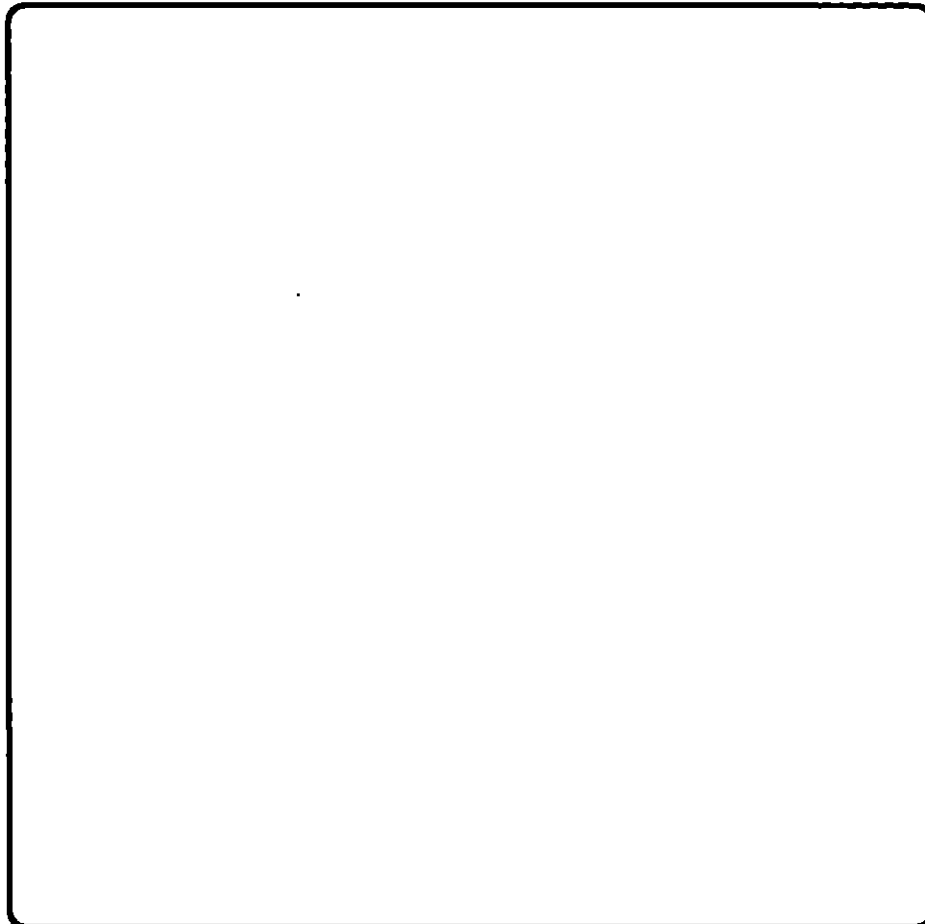
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☐ Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: publicación con su traducción y documento de notificación de registro de cambio de nombre del solicitante con su traducción, dibujos.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 53.215

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
27 de Octubre de 2005 (27.10.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/099337 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes?
clasificación

No hay

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/GB2005/001465

(22) Fecha de Registro Internacional:
15 de Abril de 2005 (15.04.2005)

(25) Idioma de Registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
0408390.3 15 de Abril de 2004 (15.04.2004) GB
0419594.7 3 de Septiembre de 2004 (03.09.2004) GB

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): UNIVERSITY OF BRISTOL [GB/GB]; Senate House, Tyndall Avenue, Bristol BS8 1TH (GB).

Publicada:
— sin reporte de búsqueda internacional y para ser republicado sobre el recibo de ese reporte

(72) Inventor, e
(73) Inventor/Solicitante (para Estados Unidos de América solamente): VIRJI, Mumtaz [GB/GB]; Department of Pathology and Microbiology, School of Medical Sciences, University of Bristol, University Walk, Bristol BS8 1TD (GB).

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a "Las Notas Gulas sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(74) Agente: MCQUEEN, Andrew, Peter; Stevens Hewlett & Perkins, 1 St. Augustine's Place, Bristol BS1 4UD (GB).

(54) Título: PÉPTIDOS TERAPÉUTICOS

(57) Resumen: La presente invención provee un ligando aislado de la proteína de membrana exterior de *Moraxella catarrhalis* que se enlaza a los receptores de CEACAM, dicho ligando comprende un dominio de enlace de receptor que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo revelado, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, degenerado o producto de hidroxilación, sulfonación o glicosilación u otro producto de procesamiento secundario del mismo. La invención también provee medicamentos y vacunas que comprenden dicho ligando, y su uso en el tratamiento o profilaxis de infección. También se provee ligando, y su uso en el tratamiento o profilaxis de infección. También se provee un método de selección para la identificación de compuestos terapéuticos novedosos.

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 October 2005 (27.10.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/099337 A2

- (51) International Patent Classification: Not classified
- (21) International Application Number:
PCT/GB2005/001465
- (22) International Filing Date: 15 April 2005 (15.04.2005)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0408390.3 15 April 2004 (15.04.2004) GB
0419594.7 3 September 2004 (03.09.2004) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY OF BRISTOL (GB/GB); Senate House, Tyndall Avenue, Bristol BS8 1TH (GB).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): VIRJI, Mumtaz (GB/GB); Department of Pathology and Microbiology, School of Medical Sciences, University of Bristol, University Walk, Bristol BS8 1TD (GB).
- (74) Agent: MCQUEEN, Andrew, Peter, Stevens Hewlett & Perkins, 1 St. Augustine's Place, Bristol BS1 4UD (GB).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: THERAPEUTIC PEPTIDES

(57) Abstract: The present invention provides a ligand isolated from *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein which binds to CEACAM receptors, said ligand comprising a receptor binding domain comprising an amino acid sequence selected from the group disclosed, or a fragment, homologue, functional equivalent, derivative, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation product or other secondary processing product thereof. The invention also provides a medicament and vaccines comprising said ligand, and their use in the treatment or prophylaxis of infection. Also provided is a screening method for the identification of novel therapeutic compounds.

WO 2005/099337 A2

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

NOTIFICACIÓN DEL REGISTRO DE UN CAMBIO

(Regla 92bis.1 del PCT e
Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Para:

MCQUEEN, Andrew, Peter
Stevens Hewlett & Perkins
1 St. Augustine's Place
Bristol BS1 4UD
ROYAUME-UNI

Fecha de correo (día/mes/año)
16 de Octubre de 2006 (16.10.2006)

Archivo de referencia del solicitante o agente
APM/7168-GB

NOTIFICACION IMPORTANTE

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2005/001465

Fecha de registro internacional (día/mes/año)
15 de Abril de 2005 (15.04.2005)

1. Las siguientes indicaciones aparecieron en el registro en relación con:

☒ el solicitante ☐ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común

Nombre y Dirección

UNIVERSITY OF BRISTOL
Senate House
Tyndall Avenue
Bristol BS8 1TH
Reino Unido

País de Nacionalidad
GB

País de Residencia
GB

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

2. La Oficina Internacional por el presente notifica al solicitante que el siguiente cambio se ha registrado en relación con:

☐ la persona ☒ el nombre ☐ la dirección ☐ la nacionalidad ☐ la residencia

Nombre y Dirección

THE UNIVERSITY OF BRISTOL
Senate House
Tyndall Avenue
Bristol BS8 1TH
Reino Unido

País de Nacionalidad
GB

País de Residencia
GB

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

3. Otras observaciones, si fuese necesario:

4. Se ha enviado una copia de esta notificación a:

☐ la Oficina que recibe ☒ las Oficinas designadas relacionadas
☐ la Autoridad de Búsqueda Internacional ☐ las Oficinas seleccionadas relacionadas
☐ la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ☐ otros:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsímile No. +41 22 338 82 70

Funcionario autorizado
Pergod Claudine
Facsímile No. +41 22 338 89 65
Teléfono No. +41 22 338 92 07

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE**(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

MCQUEEN, Andrew, Peter
Stevens Hewlett & Perkins
1 St. Augustine's Place
Bristol BS1 4UD
ROYAUME-UNI

Date of mailing (day/month/year) 16 October 2006 (16.10.2006)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference APM/7168-GB	
International application No. PCT/GB2005/001465	International filing date (day/month/year) 15 April 2005 (15.04.2005)

1. The following indications appeared on record concerning: ☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative		
Name and Address UNIVERSITY OF BRISTOL Senate House Tyndall Avenue Bristol BS8 1TH United Kingdom	State of Nationality GB	State of Residence GB
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: ☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence		
Name and Address THE UNIVERSITY OF BRISTOL Senate House Tyndall Avenue Bristol BS8 1TH United Kingdom	State of Nationality GB	State of Residence GB
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to ☐ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned ☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned ☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Pergod Claudine Facsimile No. +41 22 338 89 65 Telephone No. +41 22 338 92 07
---	---

Form PCT/IB/306 (October 2005)

1/C0QV71WG0

PÉPTIDOS TERAPÉUTICOS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención provee un ligando aislado de la proteína de membrana exterior de *Moraxella catarrhalis* que se enlaza a los receptores de CEACAM, dicho ligando comprende un dominio de enlace de receptor que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo revelado, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, degenerado o producto de hidroxilación, sulfonación o glicosilación u otro producto de procesamiento secundario del mismo. La invención también provee medicamentos y vacunas que comprenden dicho ligando, y su uso en el tratamiento o profilaxis de infección. También se provee ligando, y su uso en el tratamiento o profilaxis de infección. También se provee un método de selección para la identificación de compuestos terapéuticos novedosos.

PÉPTIDOS TERAPÉUTICOS

Esta invención está relacionada con péptidos terapéuticos y en particular con péptidos terapéuticos que son útiles en la preparación de vacunas u otros tratamientos para la infección así como en la selección de compuestos para actividad farmacéutica potencial en el tratamiento de infecciones.

Los inventores presentes han identificado previamente que el antígeno Carcinoembrionario relacionado con las moléculas de adhesión celular (CEACAMs) son receptores para patógenos de membranas mucosas, especialmente para patógenos respiratorios tales como *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*. Las CEACAMs pertenecen a la familia de Antígeno CarcinoEmbrionario (CEA), un miembro de la superfamilia de inmunoglobulina. La familia del gen CEA comprende sub-familias expresadas (CEA) y secretadas (glicoproteína específica de embarazo, PSG). La sub-familia asociada con membrana redefinida como CEACAM (molécula de adhesión celular relacionada con CEA)²⁰ comprende varias glicoproteínas relacionadas de las cuales la CEACAM1 es la más ampliamente expresada en diferentes tejidos humanos ¹². Los estudios reportados por los inventores principalmente usaron células de Ovario de Hámster Chino (CHO) transfectadas con CEACAM1 (previamente calificado CD66a y BGPc) que contienen cuatro dominios extracelulares, una región TM y una cola citoplásmica corta (S) y larga (L) (formula molecular: NA1BA2-TM-S o L). Además, se usaron construcciones truncadas solubles que contienen uno o más de los dominios extracelulares. Estudios previos demostraron que tanto la *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae* marcan principalmente el dominio N de varias CEACAMs ^{7,9,10}. Tal marcado puede conducir a la unión de superficie celular así como a la invasión celular⁹. Además, las bacterias pueden enlazarse a las CEACAMs sobre las células fagocíticas y los linfocitos T y B. Tales interacciones pueden conducir a muerte celular bacteriana ⁸, muerte celular marcada o inhibición de la función inmune, e.g., de los linfocitos T y B, cuando la *N. gonorrhoeae* (estrechamente relacionada con la *N. meningitidis*) se enlaza a las CEACAMs de estos linfocitos ^{21,22}.

La presencia de ligandos de enlace de CEACAM en la *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae* han sido un hallazgo sorprendente para los inventores presentes porque las CEACAMs han sido asociadas por largo tiempo con las proteínas Opa de membrana exterior, asociadas con la opacidad, de *Neisseriae* y, ni la *Haemophilus Influenzae* ni la *Moraxella Catarrhalis* producen proteínas Opa. En la siguiente descripción, la presente invención describirá en particular la relación con la infección de las membranas mucosas, especialmente de las membranas respiratorias, o la infección del oído (especialmente otitis media) pero se debe entender que la invención encuentra igual utilidad en otras áreas tales como mucosa genital o uretral, en donde los receptores CEACAM están implicados en la infección u otros procesos de enlace del receptor, o en cualquier otra parte de infección humana en donde las bacterias pueden llegar a diseminarse desde las superficies mucosas.

Los patógenos mucosos *Neisseria meningitidis* (Nm), *Haemophilus influenzae* (Hi) y *Moraxella catarrhalis* (Mx), son organismos específicos de humanos y residen en el tracto respiratorio superior desde donde se diseminan para causar infecciones serias. Las cepas meningocócicas de distintos serogrupos pueden ser cargadas dentro de la nasofaringe de hasta el 25% de los individuos adultos ¹. Sin embargo, en un número de sujetos, el organismo invade la barrera mucosa para causar una de las enfermedades de más rápido avance y extremadamente seria. Los factores precisos que aumentan la susceptibilidad del huésped a la infección meningocócica no están entendidos totalmente. Más aún, la protección limitada producida por vacunas específicas de grupo y la no inmunogenicidad del grupo B polisacárido recalca la necesidad de estudios fundamentales para entender la susceptibilidad del huésped e identificar las características sub-capsulares destacadas que podrían servir como objetivos comunes para combatir el meningococo. Los estudios de los presentes inventores han proporcionado un entendimiento de las bases moleculares de la colonización meningocócica, la naturaleza de sus interacciones con células barrera humanas (epitelial y endotelial) así como con células fagocíticas. En años recientes, las bases para la colonización mucosa del comensal *Neisseriae* han sido investigadas para entender las características que la diferencian entre colonizadores ampliamente inofensivos y patógenos ocasionales pero serios como la Nm. Adicionalmente, los estudios han

determinado si el comensal *Neisseriae* podría usarse como vehículo de antígenos de vacuna potenciales de Nm.

Hasta el 75% de individuos saludables pueden portar cepas que pertenecen a las especies *H. influenzae* ². Aunque, como resultado de la vacuna Hib, ha habido un decrecimiento dramático en la incidencia de la enfermedad de tipo b en el Oeste, las enfermedades causadas por las cepas de Hi no clasificables (NTHi) permanecen como un problema mayor. La NTHi causa infecciones tanto localizadas como diseminadas que incluyen epiglotitis, otitis media, celulitis, neumonía, endocarditis, bacteremia y meningitis. La otitis media es uno de los mayores problemas en la medicina pediátrica y la NTHi es responsable de más del 20% de episodios en los niños durante el primer año de vida ^{2,3}. La NTHi también está asociada con infecciones agudas recurrentes y persistentes en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y fibrosis quística. Lo que determina las infecciones recurrentes por NTHi en estos pacientes, o episodios múltiples de otitis media en niños no es claro ^{2,3,4}.

La *Moraxella cararrhalis*, otro residente del tracto respiratorio humano, es usualmente aislada de los casos de infecciones localizadas junto con Hi. Ambos organismos están asociados con sinusitis y exacerbaciones de las condiciones asmáticas ^{5,6}. La Mx es la tercera causa más común de otitis media en niños (se estima que es responsable de 3-4 millones de casos anualmente). También causa infecciones del tracto respiratorio inferior en adultos, especialmente en pacientes con COPD ⁵. En raras ocasiones, ha sido asociada con infecciones diseminadas ⁵. Tanto la Hi como la Mx causan infecciones persistentes y se cree que escapan a los mecanismos inmunes del huésped y a los antibióticos mediante penetración del tejido ⁴. Varias proteínas de membrana exterior de Mx han sido estudiadas con respecto a sus propiedades adhesivas. Sin embargo, se han identificado pocos receptores celulares para Mx y muchos de los detalles de los mecanismos patogénicos permanecen en investigación ^{4,5,6}.

Un requerimiento primario para los patógenos mucosos respiratorios es el establecimiento de un contacto firme con las células epiteliales respiratorias. Los objetivos de estos patógenos trópicos humanos son moléculas específicas de humanos, y los estudios se han basado en tejido

humano *in vitro* y cultivos de órganos. La unión es usualmente mediada por estructuras de fase bacteriana y variables antigénicamente. En adición, se ha vuelto crecientemente claro que la unión de patógenos tiene múltiples facetas y la adaptación ambiental juega un papel significativo en la forma de unión. Aunque muchos estudios recientes han empezado a definir varias etapas en los mecanismos de marcado celular complejos, los detalles de la adaptación ambiental o inter-relación microbiana del huésped permanecen a ser descritos.

Estudios recientes de los presentes inventores han mostrado que la Nm⁷⁻⁹ y la Hi^{10,11} comparten algunos mecanismos de marcado distintos y otros comunes de ciertas CEACAMs de receptores de superficie de célula humana¹².

Además, los presentes inventores han identificado recientemente que los aislados clínicos de *Moraxella catarrhalis* también marcan las moléculas CEACAM humanas. Adicionalmente, ahora se ha encontrado que una proteína de membrana exterior de *Moraxella* de alto peso molecular se enlaza al receptor. Se ha demostrado la expresión de las CEACAMs en diferentes tejidos¹² incluyendo células epiteliales respiratorias. Estas observaciones implican que el marcado específico de las CEACAMs es de ventaja particular para las bacterias respiratorias y puede haber surgido como resultado de la evolución convergente.

Entre los factores de adhesión elaborados por la *Neisseria meningitidis* están los pili (fimbrias)^{13,14,16} y las proteínas de opacidad de membrana exterior, Opa y Opc^{15,16}. Las pili de Nm son estructuras de proteína filamentosas largas compuestas de múltiples subunidades pili. Están referidas generalmente como las adhesinas más importantes en las bacterias capsuladas^{13,14,15}, debido al hecho que la cápsula enmascara parcialmente o totalmente los ligandos de membrana exterior produciendo su reducida eficacia funcional, mientras que las pili atraviesan la cápsula y permanecen funcionales en la totalidad de las bacterias encapsuladas. Las Opa son una familia antigénicamente variable de proteínas y se encuentran tanto en la *N. meningitidis* como en la *N. gonorrhoeae*. En el meningococo, el código de los sitios 3 – 4 del gen *opa* para proteínas de transmembrana relacionadas con cuatro vueltas de superficie expuestas, tres de los cuales

AA

se someten a variación de secuencia ^{16,17}. Durante los últimos 12 años, los presentes inventores han investigado las relaciones estructura/función de las pili de Nm, la virulencia potencial de las proteínas Opa y Opc, e identificaron dos receptores humanos para las proteínas de opacidad neisserial. Además, los presentes inventores han estudiado el papel de los ácidos siálicos de superficie en las interacciones bacterianas con células objetivo humanas, así como el papel de LPS y otros factores en la toxicidad celular.

La presente invención es el resultado de la identificación de los inventores de un ligando de alto peso molecular aislado de la proteína de membrana exterior de *Moraxella* que se enlaza a los receptores de CEACAM.

El ligando se puede caracterizar por su patrón de migración SDS-PAGE que es indicativo de la familia USP de proteínas en las que se rompe a monómeros que tienen un peso molecular entre aproximadamente 60 y 150 kD cuando son ebullidos por un período prolongado.

El ligando ha sido caracterizado en la cepa de Mx ATCC 25238 (MX2) como UspA1 y su secuencia de amino ácido ha sido determinada. El ligando ha sido caracterizado además para determinar la región de enlace del receptor o dominio, *i.e.*, péptido o características asociadas de péptido que se enlazan al receptor.

En consecuencia, la presente invención provee un ligando aislado de la proteína de membrana exterior de la *Moraxella catarrhalis*, que se enlaza a los receptores CEACAM, en donde dicho ligando es un polipéptido que comprende o consiste de un dominio de enlace de receptor que comprende o consiste de una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo consistente de los residuos 463 a 863, 527 a 623, 527 a 668, 527 a 863, 427 a 623, 427 a 668, y 427 a 863 de la secuencia mostrada en la Figura 6, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, degenerado o producto de hidroxilación, sulfonación o glicosilación, u otro producto de procesamiento secundario de la misma.

En una realización preferida, el ligando es un polipéptido que comprende o consiste de una secuencia de amino ácido seleccionada del

grupo que consiste de los residuos 527 a 623, 527 a 668, y 427 a 623 de la secuencia mostrada en la Figura 6, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, degenerado o producto de hidroxilación, sulfonación o glicosilación u otro producto de procesamiento secundario de la misma.

El término **ligando** se usa aquí para denotar tanto la molécula que se enlaza al receptor y cualquier parte de esta, que incluye el dominio de enlace del receptor de forma que retiene la propiedad enlazante del receptor. Así, "ligando" abarca moléculas que consisten solo del dominio de enlace del receptor, *i.e.*, la región o regiones de péptido requeridas para el enlace del receptor.

En otra realización preferida, el polipéptido comprende o consiste de al menos una de las secuencias conservadas de entre la región 427 a 623 de la secuencia mostrada en la Figura 6 que están identificadas en la alineación mostrada en la Figura 27. Así, en esta realización, el polipéptido comprende o consiste de al menos una de:

QHSSDIKTLK,
 NVEEGLLDLSGRLIDQKADKTKDIK,
 NVEEGLLGSLGRLIDQKADIKNQA,
 DIAQNQT,
 DIQDLAAYNELQD,
 QTEAIDALNKASS,
 TAEIGIAENKKDAQIAKAQANENKDGIK,
 NQADIQLHDKKITNLGILHSMVARAVGNNTQGVATNKADIAK,
 NQADIANNKNIYELA,
 NQADIANNI,
 NIYELA

Se entenderá que los ligandos de polipéptido de la invención pueden comprender un dominio de enlace de receptor de la secuencia citada aquí, que es modificada mediante la adición o eliminación de residuos de amino ácido hacia o desde las secuencias citadas aquí, en cualquiera o ambos de los terminales N o C, cuyos péptidos modificados retienen la actividad para enlazarse a los receptores CEACAM. En consecuencia, la invención comprende además un ligando que comprende o consiste de un polipéptido

en el cual 50, 40, 30, 20, 10, 5, 3 o 1 residuo de amino ácido ha sido adicionado o eliminado de una secuencia de amino ácido citada aquí, en cualquiera o ambos de los terminales N o C, en donde dicho polipéptido modificado retiene la habilidad para enlazarse a los receptores SEACAM y/o elicitar una respuesta inmune contra el péptido no modificado. Preferiblemente, el amino ácido en la posición 560 es retenido en el péptido modificado.

Con respecto a los fragmentos de los polipéptidos de la invención, se puede usar cualquier fragmento en la invención siempre y cuando el fragmento retenga la habilidad para enlazarse a los receptores CEACAM. Puede ser deseable aislar un péptido mínimo que contiene únicamente aquellas regiones requeridas para el enlace del receptor.

Los ligandos de polipéptido de acuerdo con la invención se pueden derivar a partir de las proteínas UspA1 de *Moraxella catarrhalis* mediante truncamiento en cualquiera o ambos terminales N y C. En consecuencia, la invención provee además una secuencia de UspA2 tipo nativa que carece de al menos (o exactamente) 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160, etc., hasta 520 amino ácidos del terminal N, y/o carece de al menos (o exactamente) 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160, 180 o 200 amino ácidos del terminal C. Preferiblemente, el truncado retiene la función de enlace a CEACAM. Posibles truncados se pueden seleccionar de aquellos mostrados en la siguiente tabla, todos los cuales están dentro del alcance de la invención.

Tabla I. Combinaciones Posibles de truncaciones a los terminales N y C de la proteína UspA1 del tipo nativa.

No. de amino ácidos faltantes, al menos o exactamente:														
<u>Del</u> <u>Terminal</u> <u>N</u>	<u>Del Terminal C</u>													
<u>0</u>	<u>X</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>20</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>30</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>

<u>40</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>50</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>60</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>70</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>80</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>100</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>120</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>140</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>160</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>180</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>200</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>220</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>240</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>260</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>280</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>300</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>320</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>340</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>360</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>380</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>400</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>420</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>440</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>460</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>480</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>500</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>
<u>520</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>100</u>	<u>120</u>	<u>140</u>	<u>160</u>	<u>180</u>	<u>200</u>

Las secuencias de UspA1 del tipo nativa conocidas que pueden ser truncadas de esta forma son aquellas de las cepas ATCC25238 (MX2; No. de acceso GeneBank No. AAD43468), P44 (AAN84895), O35E (AAB96359), TTA37 (AAF40122), O12E (AAF40118) O46E (AFF36416), V11171 (AAD43469), TTA24 (AAD43467) (ver Ejemplo 10, Tabla III).

Idealmente el truncado de UspA1 de esta realización comprende o consiste de una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de los residuos 463 a 863, 527 a 623, 527 a 668, 527 a 863, 427 a 623, 427 a 668, y 427 a 863 de la secuencia mostrada en la Figura 6, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado o producto de hidroxilación, sulfonación o glicosilación u otro producto de procesamiento secundario de la misma, o comprende o consiste de al menos una de las secuencias conservadas de entre la región 427 a 623 de la secuencia mostrada en la Figura 6 que se identifican en la alineación mostrada en la Figura 27, por ejemplo:

QHSSDIKTLK,
 NVEEGLLDLSGRLIDQKADLTCKDIK,
 NVEEGLLDLSRGLIDQKADIAKNQA,
 DIAQNQT,
 DIQDLAAYNELQD,
 QTEAIDALNKASS,
 TAEGLIAENKKDAQIAKAQANENKDGIAK,
 NQADIQLHDKKITNLGILHSMVARAVGNNTQGVATNKADIAK,
 NQADIANNIKKNIIYELA,
 NQADIANNI,
 NIYELA.

Puede ser conveniente producir proteínas de fusión que contienen ligandos de polipéptido como se describen aquí. En consecuencia, en una realización adicional, la invención provee proteínas de fusión que comprenden ligandos de polipéptido de acuerdo con la invención. Preferiblemente, una proteína de fusión de acuerdo con esta realización es menos del 50% idéntica a cualquier secuencia de longitud total conocida sobre su longitud total.

Los péptidos homólogos pueden ser identificados mediante comparación de secuencia. Los péptidos homólogos son preferiblemente al menos 60% idénticos, más preferiblemente al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 99% idénticos en el orden ascendente de preferencia a las secuencias de péptido reveladas aquí o fragmentos de las mismas, sobre su longitud total.

Preferiblemente el amino ácido en la posición 560 o la posición homóloga es lisina.

La Figura 20 muestra una alineación de secuencias de péptido de origen diferente que indica regiones de secuencia que son capaces de ser modificadas mientras retienen la función (p.e., la habilidad de enlace a CEACAM).

Los inventores han determinado que la habilidad de enlace a CEACAM del logando de péptido está asociada con una confirmación de base α -helicoidal determinada mediante espectroscopia de dicroísmo circular (CD), opuesta a una estructura de espiral aleatoria. En consecuencia, en una realización preferida, el ligando de péptido o dominio de enlace de receptor de la invención, o fragmento u homólogo u otro derivado del mismo adopta una estructura α -helicoidal. Opcionalmente, la estructura es una estructura de espiral enrollada. Preferiblemente, la espectroscopia CD se realiza como se describe en los ejemplos acompañantes.

En una realización adicional, la invención provee péptidos que son estructuralmente homólogos a los péptidos revelados aquí o fragmentos de los mismos. Un péptido estructuralmente homólogo es un péptido homólogo como se describió anteriormente, que produce una traza de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) indicativa de una conformación de base α -helicoidal como se muestra en la Figura 18. Los mimótopos de los péptidos revelados aquí o fragmentos de los mismos también están contemplados. Los mimótopos pueden comprender amino ácidos D p sustituciones de amino ácido no naturales pero que aún retienen las características funcionales de los péptidos revelados aquí, incluyen una traza de CD indicativa de una conformación en base α -helicoidal.

La conformación en base α -helicoidal revelada por los inventores indica que los péptidos revelados aquí poseen una estructura de sub-unidad globular que no se basa en una membrana asociada para alcanzar la conformación apropiada para el enlace de CEACAM. En consecuencia, en aún una realización adicional, la invención provee una molécula de sub-

unidad globular que comprende el ligando de péptido o dominio de enlace de receptor de la invención que no es una proteína UspA1 de longitud total, y que es capaz de enlazarse a los receptores CEACAM sin la necesidad que esté presente una membrana exterior. Preferiblemente, la molécula de subunidad globular comprende menos de 200 amino ácidos, más preferiblemente menos de 100 amino ácidos.

Dominios de enlace del receptor estructuralmente y/o funcionalmente equivalentes también se pueden encontrar en las proteínas tipo UspA ya que las proteínas híbridas se encuentran en la Mx que pueden contener epítopes mosaicos derivados de proteínas UspA y UspB ²³. Los ligandos que comprenden tales dominios de enlace de receptor equivalentes también están dentro del alcance de la invención.

La propiedad de enlace de CEACAM al ligando de péptido significa que tiene utilidad tanto como un antígeno (i.e., en una vacuna) como un "antibiótico" por medio del cual es administrado con el fin de bloquear el enlace de SEACAM y así evitando el enlace y entrada del patógeno.

Así, el ligando o domino de enlace de receptor es preferiblemente adecuado para uso en la prevención o tratamiento de la infección.

La presente invención también provee una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína ligando de la presente invención junto con homólogos, fragmentos, polimorfismos, degenerados y variantes empalmadas de estos.

El ligando de la invención, o combinaciones de este se pueden usar en una vacuna u otro tratamiento profiláctico de la infección.

La vacuna u otro tratamiento profiláctico pueden comprender cualquier adyuvante, vehículo, excipiente, aglutinante, portador, preservativo y similares adecuados, para proporcionar una preparación farmacéuticamente aceptable del ligando para uso en el tratamiento de un paciente.

La invención también provee una preparación farmacéuticamente aceptable del ligando para uso en medicina.

La preparación farmacéuticamente aceptable del ligando se puede usar en el tratamiento o prevención de cualquier enfermedad en donde los receptores de CEACAM está implicados, por ejemplo, en el tratamiento o prevención de la infección, enfermedad respiratoria, enfermedades neoplásicas y condiciones asociadas de enfermedades neoplásicas, y angiogénesis.

Preferiblemente, cuando una infección es tratada, la infección es, o se encuentra en la membrana mucosa, especialmente una infección respiratoria.

Lo más preferido, el ligando se usa como una vacuna o en otra profilaxis o tratamiento de la *Neisseris meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*. Idealmente, el ligando se usa como una vacuna o en otra profilaxis o tratamiento de otitis media.

En un aspecto adicional, el ligando de la presente invención también se puede usar para identificar reactivos de bloqueo novedosos para uso como agentes terapéuticos para proteger grupos vulnerables y al público en general contra varios patógenos mucosos. Por ejemplo, el ligando se puede usar para identificar los análogos de receptor que son útiles para este propósito.

Así, la presente invención también provee un ensayo de selección para la identificación de reactivos de bloqueo novedosos para uso como agentes terapéuticos, el ensayo comprende los pasos de selección de agentes terapéuticos potenciales por su habilidad para imitar, o por su homología al ligando de la presente invención. La invención provee además agentes terapéuticos identificados mediante el ensayo de selección mencionado anteriormente.

Se pueden producir componentes de vacuna efectivos mediante el uso de la información de los mecanismos de marcado del receptor, identificados por la presente invención, tales como imitadores de péptido

biológicamente activos. Estos podrían prevenir la colonización/invasión bacteriana de la mucosa así como producir anticuerpos que puedan ser bloqueadores, opsónicos y bactericidas.

Las secuencias de péptido biológicamente activas derivadas bacteriamente, identificadas por el ligando de la presente invención se podrían usar para estudiar los roles de las CEACAMs in el cáncer y el desarrollo en la medida en que las moléculas están asociadas con estos procesos. Estos también tienen potencial como agentes anti-cáncer y para controlar o, de otra forma en el tratamiento de angiogénesis.

La información generada por los inventores con respecto a la conformación del ligando de péptido de la invención podría usarse para diseñar una nano-estructura sintética, e.g., de plástico. Tal estructura tendría las ventajas de ser resistente a la degradación biológica y no inmunogénica. Como tal, debe ser particularmente útil como un "antibiótico" que actúa para prevenir el enlace y entrada del patógeno bloqueando los receptores CEACAM.

En una realización adicional, la invención provee el uso de un ligando de enlace del receptor de CEACAM en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad en la cual los receptores de CEACAM están involucrados en el marcado celular del patógeno que causa la enfermedad, en donde el ligando comprende o consiste de una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de los residuos 463 a 863, 527 a 623, 527 a 668, 527 a 863, 427 a 623, 427 a 668, y 427 a 863 de la secuencia mostrada en la Figura 6, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, degenerado o producto de hidroxilación, sulfonación o glicosilación, u otro producto de procesamiento secundario de ésta.

Otros ligandos adecuados para uso en este aspecto de la invención son los polipéptidos que comprenden o consiste de al menos una de las secuencias conservadas de entre la región 427 a 623 de la secuencia mostrada en la Figura 6 que están identificadas en la alineación mostrada en la Figura 27, por ejemplo:

QHSSDIKTLK,
 NVEEGLLDLSGRLIDQKADLTCDIK,
 NVEEGLLDLSRGLIDQKADIANKQA,
 DIAQNQT,
 DIQDLAAYNELQD,
 QTEAIDALNKASS,
 TAEIGIAENKKDAQIAKAQANENKDGIAK,
 NQADIQLHDKKITNLGILHSMVARAVGNNTQGVATNKADIAK,
 NQADIANNIKKNIYELA,
 NQADIANNI,
 NIYELA.

Preferiblemente, la enfermedad es seleccionada del grupo consistente de infección, enfermedad respiratoria, enfermedad neoplásica y condiciones asociadas de enfermedad neoplásica, y angiogénesis.

Los medicamentos como se describieron anteriormente, son de utilidad particular cuando el patógeno infecta, o entra mediante una membrana mucosa.

Los medicamentos como se describieron aquí son particularmente útiles en el tratamiento o prevención de infecciones (enfermedad) causada por la *Moraxella catarrhalis*. Sin embargo, los ligandos como se describen aquí son útiles en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de cualquier enfermedad en donde los receptores de CEACAM están implicados, tales como enfermedades causadas por *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*.

En una realización particularmente preferida, la enfermedad es otitis media.

Los ligandos de la invención también se pueden usar en el tratamiento de enfermedades causadas por otras bacterias orales tales como caries dental.

La bacteria oral *Fusobacterium nucleatum* está asociada con la enfermedad periodontal, pero también ha estado vinculada con la otitis

media, partos muertos y en raros casos con bacteremia. El trabajo reciente de los inventores ha mostrado que varios aislados de *Fusobacterium nucleatum* se enlazan a las CEACAMs y que el enlace de CEACAM1 a *F. nucleatum* puede ser inhibido por un ligando de polipéptido como se revela aquí sugiriendo que los ligandos o dominios de enlace de receptor de la invención tienen utilidad en el tratamiento o prevención de enfermedades causada por este patógeno.

La habilidad de D-7, un ligando de polipéptido preferido de acuerdo con la invención, bloquea las interacciones de bacterias no encapsuladas o encapsuladas con HeLa-CCiH (Ejemplo 7), bloquea el enlace a CEACAMs múltiples y su eficacia contra un número de especies oportunistas mucosas (Ejemplo 7), lo hace un agente anti-microbiano con potencial significativo. Adicionalmente, si habilidad para evocar la respuesta de anticuerpo que bloquea la adhesión de Mx (Ejemplo 8) sugiere su potencial como un candidato de vacuna, sola o como una parte de una vacuna de multicomponentes (junto con otros antígenos de Mx tales como: UspA2, Hag/MID, OMPCD, Mcap) para evitar la otitis media o infecciones pulmonares en las cuales la Ms está usualmente implicada ⁵. Las vacunas basadas en adhesinas se ha usado exitosamente, por ejemplo contra la *Escherichia coli* uropatogénica en un modelo de cistitis de ratón mediante vacunación sistémica ²⁹.

La inclusión de un ligando de acuerdo con la invención como un fármaco profiláctico se puede considerar en una variedad de situaciones en donde el riesgo de adquirir cepas particularmente virulentas o resistentes a antibiótico es alto y pueden ser entregadas mediante aplicación tópica directa o mediante probióticos. En el caso de bacterias que se unen a tejidos objetivos mediante interacciones de carbohidrato-lecitina, los carbohidratos han prevenido exitosamente las infecciones en modelos de *in vitro* y de animal ^{30, 31, 32}. La aplicación tópica de un péptido sintético correspondiente a una región de proteína SAI/II de *Streptococcus mutans* mostró que inhibía el enlace por *S. mutans* en sujetos humanos. Es estudio usó péptido a 1 mg·ml⁻¹ en un lavado bucal diario por 2 semanas y esto fue suficiente para prevenir la colonización ³³. Los probióticos en la forma de lactobacilli se han usado para prevenir numerosas infecciones ^{34, 35}. Adicionalmente, una cepa *E. coli* recombinante se ha usado como un

probiótico en el cual los genes LPS fueron modificados para codificar un mimico estructural del receptor de toxina Shiga. La administración oral de esta cepa mostró prevenir la muerte en ratones del sometimiento letal con toxina shiga que produce *E. coli* ³⁶. Los péptidos de interferencia aplicados tópicamente tienen una ventaja adicional en que pueden ser entregados cuando y en donde se requieren mediante el uso de probióticos o mediante vectores de expresión que pueden ser controlados para el tiempo o los niveles de expresión. Así, la extensión de exposición del agente antimicrobiana puede ser controlada ^{37,38}.

La interferencia mediante el marcado del dominio de enlace del receptor, imita la adherencia bacteriana y es improbable tener efecto nocivo sobre y por encima de ese enlace de ligandos bacterianos comensales nativos. Además, tal estrategia específica asegura la tolerancia hacia otra microflora comensal, muy pocas de las cuales se enlazan a CEACAMs ^{7, 10, 38}. Más aún, la naturaleza monomérica y monovalente de la forma predominante del péptido es menos probable que provoque señalización indeseada que, para las CEACAMs, parece ser inducida en la acumulación de receptor ^{11, 39}.

Puede existir alcance para el mejoramiento de D-7 identificando adicionalmente los amino ácidos críticos involucrados en la interacción de CEACAM y las modificaciones para reducir su tamaño mientras se asegura el enlace así como su longevidad *in vivo*. Tales modificaciones podrían incluir la incorporación de amino ácidos no naturales o D ³³. Es improbable que ocurra resistencia a tales tratamientos anti-adhesivos/anti-invasivos porque cualquier cambio en el ligando bacteriano es probable que los conduzca a ellos mismos a una pérdida de función y en este caso a colonización/infección. No se esperaría que la aparición de mutantes con especificidad de receptor completamente alterada debido a la competición de péptido surgiera más frecuentemente que lo usual porque la competición para el receptor es probablemente entre patógenos en la situación natural. Así, D-7 tiene un potencial para servir como un agente anti-adhesivo contra varios patógenos y como un candidato de vacuna.

Las realizaciones de la presente invención serán ahora descritas únicamente a manera de ejemplo no limitante en el cual se hace referencia a los figuras de las cuales:

La Figura 1 es una gráfica que muestra los niveles de enlace relativos de la construcción de receptor soluble CEACAM1-Fc ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) solo (barras blanca, mano izquierda), o en presencia del anticuerpo YTH71.3 específico del dominio de N de CEACAM1 (barras gris, central) para 3 cepas de Mx inmovilizadas sobre nitrocelulosa. El enlace CD33-Fc en cada caso fue insignificante (barras negra, derecha). Cepas 1, 2, 3: MX2 (ATCC 25238), MX3, MX4 (aislados clínicos) respectivamente. El enlace se determinó en una extensión con punto de mancha y la intensidad de las reacciones se cuantificó mediante análisis densiométrico usando el programa NIH Scion Image.

La Figura 2 muestra una mancha al Occidente de las proteínas de cepa MX2 separadas bajo no disociación (no calentadas, pista 1) o después de ebullición por 10 min (pista 2). El manchado fue extendido con CEACAM1-Fc ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; a) y el enlace de receptor detectado con anticuerpo FC anti-humano conjugado a peroxidasa de rábano picante y su sustrato.

La Figura 3 muestra manchas al Occidente de lisatos de célula entera desnaturalizados de cepas MX2, -3, -4, (pistas 1-3 respectivamente) fueron extendidas con CEACAM1-Fc ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; a), anticuerpo péptido anti-UspA1 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; b) y anticuerpo péptido anti-UspA2 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; c). Note el perfil de migración similar de las proteínas de enlace de CEAM1-Fc y las proteínas de enlace Anti-UspA1 en las tres cepas. Los remanentes de proteínas no disociadas a c. 250 kDa, (detectados en este caso debido a la sensibilidad mayor de detección en el ensayo de fosfatasa alcalina) se enlazaron a CEACAM1-Fc. Estos son solamente reconocidos débilmente por los anticuerpos anti-péptidos, presumiblemente porque los epítopes contenidos en los péptidos sintéticos no están totalmente expuestos en la proteína nativa, que se torna progresivamente expuesta en la medida en que el complejo se desnaturaliza. Los anticuerpos anti-UspA2 se enlazan a las proteínas de masas aparentes > 200 kDa, que permanecen no disociadas después de ebullición, una propiedad indicativa de las proteínas UspA2.

La Figura 4 muestra un espectro de masa de péptidos tripticos de la proteína de enlace CEACAM1 de MX2 siguiendo la electro-elución (4a). El resumen de la entrada de datos en la base de datos de identificación de proteína ProFound se muestra en (4b). Una tabla de las 10 proteínas identificadas y la probabilidad de valores se muestra en (4c). El detalle del candidato clasificado en el número 1, en este caso UspA1 con un puntaje Z de 2.34 se muestra en (4d) indicando el número de péptidos coincidentes, sus posiciones dentro de la proteína, el % de proteína cubierto y una lista de péptidos no coincidentes en esta ocasión.

La Figura 5 muestra un análisis de mancha Occidental de fragmentos tripticos de UspA1 de MX2. A: Mancha de Control usando anticuerpos secundarios (mezcla de Fc anti-humano de cabra e Ig anti-conejo de cabra, usados en B y C). B: mancha extendida con CEACAM1-Fc y Fc anti-humano de cabra. C: mancha extendida con anticuerpos de conejo purificados de afinidad elevados contra el péptido UspA1 (ETNNHQDQKIDQLGYALKEQGQHFNNR) (SEQ ID NO:1) (ver Figura 6) e Ig anti-conejo. * = pistas con marcadores de peso molecular – mostrados a la izquierda. Los péptidos mostrados mediante las flechas dobles reaccionan fuertemente con CEACAM1-Fc (B) así como con los anticuerpos de péptido anti-UspA1 (C). El enlace de los anticuerpos de péptido anti-UspA1 al péptido de más bajo PM (punta de la flecha) identifica este fragmento de enlace de CEACAM con el fragmento del terminal C contenido dentro del N-199 a K-863 de UspA1 de MX2 (Ver Figura 6).

La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácido de la proteína UspA1 de MX2 (SEQ ID NO: 2). El péptido específico de UspA1 usado para elevar el antisuero en conejos se muestra en negrita. La región de enlace de CEACAM está contenida en el fragmento subrayado del terminal C del UspA1 de MX2.

La Figura 7 muestra la separación de péptidos tripticos que reaccionan con las CEACAMs. La cepa MX2 de *M. catarrhalis* se trató con 1 mg/ml de tripsina a 37°C por 10 min. La muestra tripsinizada se sometió a SDS-PAGE. Después del tñido, la región de 50 kDa fue electroeluida durante la noche. La proteína electroeluida fue liofilizada y resuspendida en amortiguador, y se aplicó a un segundo gel. Parte del gel fue manchada en

nitrocelulosa y las bandas de péptido que reaccionaron con CEACAM fueron identificadas mediante extensión con macha Occidental usando CEACAM-Fc (Mancha).

“”; denota bandas de péptido enviadas para el secuenciamiento del terminal N.

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácido de un péptido tríptico de la proteína UspA1 de MX2 (SEQ ID NO: 3). El péptido tríptico de 50 kDa mostrado (aminoácidos 463 a 863) se enlaza a CEACAM y el antisuero contra el péptido UspA1 (aminoácidos 753-780 subrayados). La secuencia del terminal N del CEACAM de c. 50 kDa que enlaza al péptido es "ALESNVEEGL" (SEQ ID NO: 4) que se encuentra después del sitio de clivado de tripsina en el amino ácido 462.

La Figura 9 muestra una representación diagramática de las posiciones de las plantillas usadas para generar los fragmentos del gen *uspA1* para la expresión de los péptidos recombinantes. El sitio de enlace de CEACAM1 fue codificado por el ADN amplificado mediante las plantillas P4 y P7, se diseñaron y usaron plantillas adicionales a lo largo de esta región (letras A-I).

La Figura 10 muestra la secuencia del fragmento recombinante 4-7 (SEC ID NO: 5). La región subrayada es la región del terminal N del péptido tríptico reactivo de CEACAM1. El peso molecular predicho del fragmento 4-7 es c. 26 kDa. El PM predicho del fragmento His-marcado: c. 28 kDa. La posición del péptido truncado está mostrada por "T" (Ver Figura 3).

La Figura 11 es un diagrama que muestra estrategia general de clonación, expresión y purificación para los péptidos UspA1 recombinantes, como lo ejemplariza el sistema pQE30.

La Figura 12 es un mapa del vector pQE30.

La Figura 13 muestra en enlace de CEACAM-Fc en extensión de mancha a los polipéptidos recombinantes 4-8 (pista 3), 4-T (pista 4) y 4-7 (pista 5). La pista 1 contenía un péptido recombinante de control

Treponemal y la pista 2 contenía lisatos de M15 no inducido que contienen la construcción 4-8.

La Figura 14 muestra manchas Occidentales que muestran la reactividad del péptido recombinante con el anticuerpo etiqueta anti-His (superior) y CEACAM1-Fc (inferior). Las pistas 2-4 contenían el péptido 6-8, la pista 1 contenía 4-8 como control. Las posiciones de migración predichas de los péptidos se muestran a la derecha. Ambos péptidos se enlazan al anticuerpo anti-His. Sin embargo, mientras que 4-8 se enlaza al CEACAM1-Fc, 6-8 no lo hace.

La Figura 15 muestra que el polipéptido D-8 se enlaza a CEACAM1-Fc (pista 1) pero no a CD33-Fc usado como control (pista 2). El origen de este péptido se confirmó mediante reactividad con el anticuerpo de etiqueta anti-His (pista 3).

La Figura 16 es un diagrama esquemático de los tamaños y posiciones relativas de los fragmentos de rUspA1. El recombinante 4-7 se ha usado para el bloqueo bacteriano – ver Figura 17.

La Figura 17 muestra que los transfectantes CHO-CEACAM1 fueron incubados en ausencia de péptidos (A) o con el péptido de control recombinante (un péptido treponemal, B), o el péptido r4-7 de UspA1 (secuencia correspondiente a la cepa MX2, C y D) a las concentraciones mostradas, y se agregaron bacterias por un período de 2 horas. Al final de esta incubación, las bacterias no enlazadas fueron lavadas y las bacterias enlazadas fueron detectadas con antisuero policlonal de anti-*M. catarrhalis* y anticuerpo secundario conjugado de TRITC. A 1 µg/ml, se obtuvo una inhibición significativa de una cepa heteróloga de *M. catarrhalis*, y a 10 µg por ml, el enlace de *H. influenzae* se inhibió significativamente mediante el péptido recombinante UspA1 de *M. catarrhalis*.

La Figura 18 es una gráfica que muestra los espectros de dicroísmo circular del péptido D-7 recombinante y D-7 con la mutación K 560 I. Los espectros indican que D-7 tiene una estructura α -helicoidal mientras que D-7 (K 560 I) adopta una formación de espiral aleatoria.

La Figura 19 muestra una serie de péptidos lineales que guardan la región D-T que no se enlaza a CEACAM1. El residuo K correspondiente a K560 de D-7 está subrayada.

La Figura 20 es una alineación de la región D-7 de las secuencias de amino ácido de las proteínas UspS1 de diez cepas de Mx: TTA24, TTA37, p44, O12E, O35E, O46E, MX2, V1171, MX3 y MX4. La línea superior muestra la secuencia mayoritaria.

La Figura 21 es una alineación manual de D-7 de O35E D-7 versus D-7 de MX2. Las líneas superiores muestran la secuencia mayoritaria.

La Figura 22 es una tabla que muestra la identidad de secuencia de las regiones D-7 de aislados de Mx determinados por MegAlign™ (DNASTAR Inc.).

La Figura 23 muestra que el péptido D-7 recombinante (pero no el recombinante 6-8, i.e., residuos E659-K863 de UspA1 de MX2) inhibe el enlace de cepas homólogas o heterólogas a células CHO transfectadas que expresan CEACAM. Seguida la preincubación de células ya sea si péptido (columna 1), péptido de control ($2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; columna 2), o D-7 ($2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; columna 3), se agregaron bacterias y las bacterias no adherentes fueron removidas mediante lavado después de 1 h de incubación. Las bacterias asociadas con las células fueron entonces detectadas usando antisuero elevado contra distintas cepas y anticuerpos secundarios conjugados con rodamina. Mx: *Moraxella caranzhalis*; Nm. *Neisseria meningitidis*; Hi: *Haemophilus influenzae*.

La Figura 24 es una serie de cuadros que muestran la inhibición de interacciones bacteriana-CC1-Fc por D-7. (a) Una inhibición dependiente de dosis del enlace del receptor a la cepa MX2 de Mx homóloga (columnas grises) y a una cepa heteróloga MX1 (columnas negras) se mostró sobre el rango de concentración del péptido $0.001\text{-}0.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. C representa el péptido de control D-8 Δ . Se muestran los valores medios $n=3$, $*P<0.015$ relativo a CC1-Fc solo. (b) El D-7 recombinante (columnas negras) pero no D-8 Δ (columnas grises) inhibe el enlace de cepas múltiples de especies

homólogas y heterólogas (indicadas por encima de cada gráfica) a CC1-Fc. Lisatos de célula entera de distintos aislados de diferentes géneros fueron salpicados a nitrocelulosa y extendidos con CC1-Fc solo o en la presencia de los péptidos ($2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ cada uno). Se obtuvieron los valores de inhibición porcentual en presencia de los péptidos con relación a su ausencia mediante análisis densitométrico usando el software NIH Scion Image. Los datos son representativos de dos a tres experimentos independientes.

La Figura 25 muestra que D-7 inhibe el enlace bacteriano a un rango de CEACAM que expresan líneas celulares. (a) El análisis de inmunofluorescencia de interacciones bacterianas con células CHO transfectadas que expresan CEACAM1 seguida de la preincubación de células sin o con péptidos ($2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) como se indicó. La inhibición de adherencia de bacterias visualizadas por etiquetado con rodamina se observa en la presencia de D-7. (b) El análisis cuantitativo de inhibición del enlace bacteriano a células CHO-CEACAM1 usando un ensayo de conteo viable. Las monocapas objetivo fueron preincubadas con péptido de control ($2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; C) o un rango de D-7 como se muestra. Se muestran los valores medios de % de inhibición con D-7 comparado con el péptido de control ($n=3-6$, $*P<0.05$). Las cepas usadas en a y b fueron: Mx (MX1), Nm (C751D), Hi (THi, Rd) y Hi-aeg (A3). (c) la inhibición del enlace de Nm (C751D) a distintas CEACAMs por D-7. Células HeLa que expresan CEA o CEACAM6 (CC6) fueron preincubadas ya sea sin péptido, péptido de control ($2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; columnas grises), o D-7 ($2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; columnas negras). Se obtuvieron los números medios de Nm adherente por célula usando un ensayo de inmunofluorescencia y mediante conteo directo de 20 células en cada caso. (d) Una línea celular HeLa con niveles altos de expresión CEACAM1 (HeLa-CC1H) que soporta la adhesión vía pili y proteína Opa, fue infectada con h18.18, un derivado encapsulado y fimbriado de la cepa MC58 que expresa adhesinas Opa y Opc. La adhesión celular se redujo con adición previa (pre) o simultánea (sim) de D-7 pero sin D-8 Δ como se indicó. (e) la Inhibición de interacciones bacterianas con células epiteliales de pulmón A549 conocidas por expresar CEACAMs seguida de la preincubación de células ya sea sin péptido, con péptido de control ($2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), o D-7 ($2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) como se indicó. Las cepas usadas fueron Mx (MX1), Nm (C751D) y Hi (Hi-aeg, A3).

La Figura 26 en un cuadro que muestra que el anticuerpo de conejo purificado de afinidad elevado contra D-7 inhibe el enlace de Mx homólogo o heterólogo a CEACAM1-Fc (CC1-Fc). En un experimento de extensión de manchas punteadas, se determinó el enlace relativo a control sin anticuerpo mediante análisis densitométrico usando el software NIH Scion Image. Se observó buena inhibición para las cepas de Mx probadas pero no para otras especies bacterianas probadas incluyendo Hi (THi Rd & Hi-aeg A3), Nm (C751A & C751D) y Ng (P9-13). Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

La figura 27 muestra la adhesión de *N. Meningitidis* a células HMEC1 solas (A) o en la presencia de péptido de control (B) o el péptido de bloqueo D-7 (C). Note la inhibición completa virtual en la presencia de D-7.

La Figura 28 es una alineación múltiple de fragmentos de secuencias de proteína de UspA1 conocidas correspondientes al fragmento 4-T de la secuencia de MX2. Los residuos que están conservados en todas las secuencias analizadas están sombreados en negro. Los residuos que están conservados en todas las secuencias en donde están presentes, pero hay una eliminación de la posición correspondiente en una o más secuencias, están sombreados en gris oscuro. Cuando hay una variación en el residuo presente en esta posición, los residuos de consenso están sombrados en gris claro.

Ejemplo 1. Las cepas de *Moraxella Catarrhalis* se enlazan a CEACAM-Fc humana mediante las proteínas de UspA

Las cepas de *Moraxella catarrhalis* (Mx) usadas en este estudio incluyen aislados clínicos (MX3 y MX4) así como la cepa de referencia comprada en American Type Culture Collection (ATCC 25238, un cultivo clónico de esta fue designado MX2).

Ensayos de extensión del receptor muestran que la Mx se enlaza a las construcciones del receptor CEACAM-Fc

Para evaluar la interacción de las cepas de *M. catarrhalis* con CEACAM1, se aplicaron bacterias (c. $4 - 8 \times 10^6$) a nitrocelulosa, aire seco y los sitios de ligamiento no específico bloqueados en BAS-PBST al 3%. Las tiras de nitrocelulosa fueron recubiertas con CEACAM1-Fc ($1-2 \mu\text{g ml}^{-1}$) solo, o en presencia de el anticuerpo YTH71.3 del dominio de N de CEACAM1. Se uso CD33-Fc ($1-2 \mu\text{g ml}^{-1}$) como control negativo. Las construcciones de proteína quimérica se prepararon como se describió anteriormente ¹¹. El enlace del receptor quimérico se detectó mediante anticuerpos anti-humanos Fc de cabra conjugados ya sea con peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Se desarrollaron manchas con diamino bencideno y peróxido de hidrógeno, o sustratos de tetrazolio de nitroazul y 5-bromo-4-cloro-3-indolifosfato respectivamente. Todas las cepas Mx se enlazaron a CEACAM1-Fc pero no a CD33-Fc (Fig. 1). El enlace del receptor se inhibió en presencia del anticuerpo YTH71.3 monoclonal, sugiriendo que las cepas se enlazaron al dominio del terminal N del receptor. En consecuencia, todas las cepas se enlazaron igualmente bien a la construcción N-Fc truncada de CEACAM1, que contenía solo el dominio N (no mostrado).

Identificación de la proteína de enlace de CEACAM1-Fc de *M. catarrhalis*

Lisatos de célula enteros de Mx (c. 3×10^7) fueron aplicados a pistas individuales de un gel de poliacrilamida bis-tris al 10% (Invitrogen), sin tratamiento de calor previo o después de calentamiento a 100°C por 10 minutos, y sometidos a electroforesis por 45 min a 180 V. Las proteínas de los geles fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa usando condiciones de manchado estándar. Las membranas de nitrocelulosa fueron extendidas con construcciones quiméricas solubles como se describió anteriormente. En cada caso, se observó que una proteína simple se enlazó específicamente a CEACAM1-Fc. La migración de la proteína sobre los geles fue indicativa de la proteína UspA de Mx, porque cuando los lisatos bacterianos fueron aplicados sin desnaturalización de calor, las proteínas de enlace de CEACAM1 migraron con una masa aparente de $> 200 \text{ kDa}$, mientras que cuando los lisatos primero se calentaron, las proteínas de enlace de CEACAM1 migraron con una masa reducida de *circa* 92 kDa (Fig. 2).

Los anticuerpos elevados contra UspA1 pero no aquellos contra una proteína UspA2 similar se enlazaron a las proteínas de enlace de CEACAM1-Fc de las cepas de Mx

Se diseñaron péptidos según las secuencias publicadas para las proteínas UspA de cepas de *M. catarrhalis*. A saber,

ETNNRQDQKIDQLGYALKEQGQHFNNR (SEQ ID NO: 1; péptido de UspA1) y

KDEHDKLITANKTAIDANKAS (SEQ ID NO: 6; péptido de UspA2). Los péptidos fueron acoplados a KHL por medio de un residuo de cisteína de terminal N que fue incorporado, y se usaron para inmunizar conejos (200 µg de péptido por conejo) a intervalos de 14 días, inicialmente con adyuvante de Freund completo y posteriormente con adyuvante de Freund incompleto. Los conejos fueron sangrados a intervalos en el día 0 y en el día 14 post inmunización. Los anticuerpos policlonales fueron purificados usando el péptido apropiado acoplado a las columnas AminoLink Plus (Pierce). Se usaron anticuerpos específicos de UspA a una concentración de 1-10 µg ml⁻¹ para las extensiones de manchado Occidental y se detectaron con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a la fosfatasa alcalina. Las manchas se desarrollaron como se describió anteriormente. La migración de las proteínas de enlace de CEACAM1-Fc sobre SDS-PAGE de las tres cepas de Mx fue idéntica a la de las proteínas de enlace de anticuerpo de UspA1, pero no a las proteínas de enlace de anticuerpo de UspA2 (Fig. 3).

La co-precipitación del ligando de *M. catarrhalis* con CEACAM1-Fc es identificada como UspA1

Durante la noche, cultivos de bacterias fueron suspendidos en octil βD glucopiranosida 100 nM en PBSB que contenía un cocktail de inhibidor de proteasa (pic; PMSF 1 nM, E-64 1 µM, pepstatina A 1 µM, bestatina 6 nM y EDTA 100 µM). Las muestras fueron mezcladas de extremo a extremo durante la noche a 4°C. Mientras tanto 100 µl de proteína A acoplada a sefarosa CL-4B (Sigma) se incubaron con ya sea 20 µg de CEACAM1-Fc o CD33-Fc (usado como control), durante la noche a 4°C, y posteriormente se

lavó 3 veces con PBSB para remover cualquier receptor no enlazado. El material bacteriano insoluble fue removido por centrifugación a 15, 000 g por 30 min. El extracto soluble fue incubado con complejo receptor - sefarosa Proteína A por 2h a 4°C (a una relación de 5×10^8 bacterias por μg de construcción de receptor). Seguido de un lavado extensivo con octil βD glucopiranosida 50 mM y PBSB, las muestras fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE y Manchado Occidental bajo condiciones de desnaturalización.

En los experimentos de co-precipitación con CEACAM1-Fc, las MX4 produjeron una proteína fuertemente colorante de c. 97 kDa y las MX3 produjeron una proteína de relativamente débilmente colorante de c. 92 kDa. Las masas de las proteínas co-precipitadas correspondían a las observadas en los experimentos de extensión del receptor (mostrados en la Fig. 3). Ninguna proteína se co-precipitó con CD33-Fc. Las proteínas co-precipitadas fueron además identificadas como proteínas UspA1 porque se enlazaron al anticuerpo de péptido anti-UspA1. Adicionalmente, siguiendo la extirpación del gel, la proteína de MX4 se sometió a espectrometría de masas MALDI-TOF (ver a continuación).

Identificación del ligando CEACAM1 mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

(a) Muestras de extensión Occidental. Lisatos de célula entera de MX2 y MX3 fueron sometidos a SDS-PAGE en geles con surcos y la banda correspondiente al ligando de enlace de CEACAM1-Fc fue electroeluida del gel. La muestra fue concentrada y re-aplicada en una pista simple de un segundo gel, sometida a electroforesis antes de la digestión de tripsina en el gel, de la proteína apropiada. Los péptidos resultantes fueron analizados mediante espectrometría de masas de desorción Láser asistida por Matriz/ionización de tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Un ejemplo del espectro de masas resultante se muestra para la proteína de enlace CEACAM de MX2 (Fig. 4a). Las masas de péptido obtenidas fueron ingresadas al sitio de identificación de proteína ProFound y se obtuvieron los resultados como se muestran para esta proteína (Fig. 4b, c). En este caso 10 masas de péptido coincidieron con las masas predichas para péptidos trípticos de UspA1 de *M.*

catarrhalis que cubren aproximadamente el 18% de la proteína (Fig. 4d). El puntaje Z estimado de 2.34 es altamente sugestivo que es la proteína UspA1 (puntaje $Z > 1.65$ está por encima del 95 percentil); http://129.85.19.192/profpund_bin/webProfound.exe). Además, se identificó otra banda de alto peso molecular no enlazante de MX2 como UspA2 siguiendo un análisis similar. De la misma forma para la cepa MX3, se identificaron las proteínas CEACAM1 enlazantes y no-enlazantes, como UspA1 y UspA2 respectivamente.

(b) Muestras co-precipitadas: Para MX4, la proteína co-precipitada CEACAM-Fc (como se describió anteriormente) también se identificó como UspA1 mediante MS MALDI-TOF con un puntaje Z de 2.27 en toda la búsqueda taxones. Coincidieron 12 péptidos que cubren el 21% de la proteína.

Por lo tanto, este estudio ha identificado que la *Moraxella catarrhalis* marca CEACAM1 humano mediante la proteína UspA1 de alto peso molecular en la referencia y en las cepas clínicas indicadas.

Clivaje enzimático de UspA1 y péptido recombinante

(a) *Péptidos tripticos de UspA1 se enlazan a CEACAM1-Fc*

Las suspensiones bacterianas de MX2 (10^{10} ml⁻¹) fueron tratadas con tripsina (Sigma) a concentraciones de 0.1-1 mg/ml y se incubaron por 1-4 horas a 37°C. Los lisatos digeridos fueron disociados en amortiguador de SDS-PAGE, ebullidos y sometidos a electroforesis. Después de la transferencia a nitrocelulosa, las manchas fueron extendidas con la construcción del receptor CEACAM-Fc o los anticuerpos de péptido anti-UspA1 purificados por afinidad. Un pequeño fragmento que reacciona con el receptor también se enlazó a los anticuerpos específicos de anti-UspA1 (Fig. 5).

(b) *Localización del dominio enlazante de CEACAM de UspA1 de la cepa MX2 de *M. catarrhalis**

Las suspensiones bacterianas de MX2 fueron tratadas con Tripsina a 1 mg/ml por 10 minutos a 37°C.

La muestra tripsinizada se corrió en un gel SDS-PAGE. Después de la coloración, la región de 50 kDa fue electroeluida durante la noche. La proteína electroeluida fue liofilizada y resuspendida en amortiguador, y aplicada a un segundo gel. Parte del gel fue manchado en nitrocelulosa y las bandas de péptido que reaccionan con CEACAM fueron identificadas mediante extensión de manchado Occidental usando CEACAM1-Fc (Fig. 7).

Las bandas de péptido que corresponden a péptidos de circa. 50 kDa y circa. 150 kDa se sometieron al secuenciamiento del terminal N. Las secuencias del terminal N fueron ALESNVEEGL (SEQ ID NO: 4) (péptido de c. 50 kDa) y ALESNV (SEQ ID NO: 7) (péptido de c. 150 kDa). La proteína de 150 kDa es aparentemente un trímero de la proteína de 50 kDa en la medida en que tengan la misma secuencia de terminal N. La secuencia de terminal C de este péptido de UspA1 de MX2 se muestra en la Figura 8.

(c) Péptido recombinante

El péptido de MX2 recombinante de terminal N que se construyó, consistente de los amino ácidos 1 a 449 de la secuencia mostrada en la Figura 6 no se enlaza a CEACAM. Esto además indica que el péptido tríptico de c. 50 kDa que consiste de los amino ácidos 463 a 863 de la secuencia mostrada en la Figura 8, que tiene la secuencia terminal de ALESNVEEGL (SEQ ID NO: 4) contiene el dominio enlazante CEACAM.

Ejemplo 2: Identificación de los Dominios de Enlace de Receptor sobre Múltiples Determinantes de Virulencia de Patógenos Mucosos

La *M. meningitidis* y *H. influenzae* marcan las moléculas de CEACAM mediante ligandos que se enlazan a sitios de superposición en la CEACAM. Los ligandos Mx de la presente invención también marcan el dominio de N. Estas observaciones señalan una posibilidad excitante que características similares sobre ligandos de diferentes patógenos mucosos puedan estar involucradas en el marcado del receptor.

Como las interacciones Nm y Hi con las CEACAMs están directamente afectadas por las características estructurales de la superficie expresada en dominios variables, esto sugiere que pueden contener amino ácidos cruciales similares en una configuración espacial que es capaz de enlazarse al receptor, y estos pueden ser conservados en proteínas variables de otra forma. De hecho nuestros estudios y los de otros sugieren que las dos vueltas hiper-variables de Opa (HV1 y HV2) pueden estar involucradas en el marcado CEACAM^{9,18}. Una técnica poderosa que puede identificar posibles determinantes de interacciones entre ligandos y receptores es el despliegue del fago, que se puede usar para identificar mimotopos (secuencias aleatorias para imitar los dominios de enlace)¹⁹, así como aptámeros (secuencias relacionadas muy de cerca con la estructura original que inhibe en enlace del ligando)²⁰.

La invención actual también hace altamente posible que el dominio del ligando Mx que se enlaza a las CEACAMs actúe como un imitador para otros patógenos mucosos que se enlazan a CEACAM, y las características estructurales de este ligando ayudarán a identificar las características notables requeridas en los ligandos Nm y Hi para el marcado del dominio de N de CEACAM. Los anticuerpos al dominio de Mx podrían tener el potencial para identificar otros ligandos que tienen la capacidad de marcar las mismas, similares o regiones posicionadas muy cerca del receptor.

La identificación del dominio mínimo de enlace de CEACAM1 de UspA2 de MX2 está siendo asumida usando métodos conocidos de ingeniería de proteínas y tecnología de ADN recombinante. Los péptidos recombinantes pueden ser seleccionados in vitro mediante los ensayos de extensión del receptor descritos anteriormente para detectar el dominio de MX2 que se enlaza al receptor. Los péptidos marcados con His pueden ser separados en una columna de níquel, His-Tag clivados y usados para inmunizar conejos y ratones para obtener anticuerpos para investigaciones adicionales.

Se puede determinar un péptido de longitud adecuada para aplicaciones biológicas mediante el examen de las propiedades estimuladoras inmunológicas así como otras funciones tales como bloqueo del enlace del receptor.

Ejemplo 3. Características notables del Receptor requerido para las Interacciones del ligando

Como el dominio de N de CEACAM es suficiente para las interacciones de las proteínas Opa, los presentes inventores están usando una técnica de despliegue del fago también para investigar los epítopos adhesivos del dominio de N de CEACAM. El conocimiento de la(s) región(es) de enlace del ligando en el receptor, que ha sido estudiado por los presentes inventores por medio de mutagénesis de rastreo de alanina del receptor ⁹, ha facilitado este estudio. También en este caso, un ensayo de extensión de ligando está disponible para la biofiltración (concentración de afinidad) de fagos quiméricos que portan las secuencias del receptor.

Los análogos de receptor tienen el potencial de bloquear cepas múltiples independientemente del tipo de Opa producida ya que nuestros estudios ya mostraron que a pesar de su variación antigénica, las diferentes proteínas Opa requieren características comunes en el receptor para la adhesión primaria ⁹. También es de interés notar que los antígenos de CEA están despojados de la mucosa intestinal y pueden bloquear la adhesión de las cepas *E. coli* también conocidas por marcar las CEACAMs. Esto se ha propuesto como un mecanismo de inmunidad innato vs. patógenos entéricos. ¹² Así, estos análogos de receptores actúan como agentes terapéuticos.

Ejemplo 4. Producción de los los péptidos recombinantes de UspA1 de *Moraxella catarrhalls* que enlazan el CEACAM

Resumen:

La amplificación de PCR de varios fragmentos a lo largo de la longitud de UspA1 se realizó usando las plantillas mostradas en la Figura 9. Los péptidos recombinantes se obtuvieron como se describe a continuación. En la primera ronda, se encontró que el péptido recombinante que se enlaza a CEACAM1 estaba codificado por el ADN amplificado por las plantillas P4 y P8, pero no el codificado por la región entre P1 y P5. Además, el recombinante P4 – P7 se enlazó a CEACAM1 pero no P 6 – P8. Se usaron

plantillas adicionales entre la región P4 y P7. La región D7 retuvo el enlace CEACAM. La secuencia del fragmento 4-7 se muestra en la Figura 10.

Estrategia de clonación, expresión y purificación general para los péptidos UspA1 recombinantes

El fragmento 1-5 de UspA1 se produjo usando el sistema pBAD. Los productos de PCR requeridos fueron clonados a TA en el vector pBAD, y se uso la cepa TOP10 de *E. coli* para la amplificación. El resto del procedimiento fue como se muestra en la Fig. 11 con excepción que la pBAD se indujo usando arabinosa. El fragmento 4-7 se produjo usando los sistemas pBAD y pQE30 (Fig. 11) con resultados de enlace de cEACAM similares. El resto de los fragmentos se produjeron usando la estrategia de la Fig. 11.

Vector y el sistema de expresión de pQE30

Se uso el vector pQE30 (Fig. 12) en conjunción con la cepa M15 de *E. coli*. La M15 contiene el plásmido pREP4 que codifica un represor, que restringe la transcripción de ADN clonado en pQE30. La adición de IPTG a una concentración de 1 mM evita la codificación de este represor y así, la transcripción de los fragmentos clonados en pQE30.

La estrategia de clonación

Los amplímeros de PCR fueron primero ligados en pCR2.1. Esto proporcionó un huésped estable del cual el amplímero podía ser recuperado mediante la digestión de restricción (*Bam*HI/*Pst*I), asegurando que cada extremo del fragmento del gen fue cortado. La pQE30 se digirió en forma similar y se recuperó mediante purificación del gel, que también aseguró que ambos sitios de restricción habían sido cortados. El pQE30 digerido y el amplímero de UspA1 fueron ligados durante la noche a 16°C con ligasa de ADN T4, y se transformaron en M15 de *E. coli* competente de CaCl₂. Los transformantes fueron seleccionados sobre agar LB complementado con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (25 µg/ml). Se recogieron 4-8 colonias y se cultivaron en caldo LB con antibióticos. Las bacterias de 3-4 ml de

cultivo fueron recolectadas mediante centrifugación y se sometieron al método de lisis miniprep alcalina. El vector purificado fue digerido como se indicó anteriormente para verificar el inserto *de uspA1*. Las bacterias que contenían pQE30 con un inserto de tamaño correcto fueron cultivadas en cultivos de 50 ml e inducidas con IPTG (ver más adelante). Entonces se usaron Manchas Occidentales para seleccionar la producción de proteína recombinante. Además, los vectores fueron secuenciados para determinar que el inserto estuviera en la región correcta de ADN y verificar cualquier error de secuencia.

Expresión y Purificación

M15 que contenía construcciones de pQE30/*uspA1* fueron cultivadas en caldo LB (complementados con 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina), con agitación a OD600 = 0.5 antes de la adición de IPTG a una concentración 1 mM. Los cultivos fueron incubados por unas 3-4 horas adicionales y las bacterias se recuperaron mediante centrifugación. Los pellets bacterianos fueron solubilizados en amortiguador B (urea 8M, Tris 50 mM, etanol al 10%, Tween al 2%, imidazol 5mM, pH 7) por 1-3 horas, y el material de membrana fue removido por centrifugación a 20,000 g por 20 min. Los sobrenadantes fueron incubados con resina de níquel por 1-2 horas en un mezclador rotatorio, y pasados a través de cuna columna de polipropileno. La resina retenida fue lavada con 5-10 ml de amortiguador B y la proteína enlazada fue eluida con eluciones de 0.5 ml de amortiguador B complementado con imidazol 100 mM. Las proteínas eluidas fueron verificadas mediante SDS-PAGE antes de la diálisis para remover la urea y otras sales.

Fragmentos Recombinantes

A: Fragmentos 1-5 y 4-8

Estos fragmentos producidos por el sistema pBAD mostraron que 1-5 no se enlazó a CEACAM1 pero 4-8 sí.

B: Fragmentos 4-8, 4-8T, 4-7 y 6-8 producidos usando el sistema pQE30.

El fragmento 4-8 fue el primer fragmento de rUspA1 producido, y se encontró que se enlaza a CEACAM con una alta afinidad en los ensayos de extensión de mancha. Además del péptido rUspA1 4-8 de longitud total, se observó una proteína más pequeña truncada. Este péptido (designado 4-T) también se enlazó a CEACAM1 y parece estar expresado en niveles más bajos que en 4-8 (Fig. 13). El análisis de secuencia de pQE30/4-T encontró una disparidad (CAA a TAA) que condujo a un codón de terminación en el residuo Q624 (ver Fig. 10).

Los péptidos 4-7 y 6-8 se produjeron con el fin de descartar la posibilidad que se encontrara un segundo sitio de enlace de CEACAM en 6-8. Como se predijo del péptido 4-T, 4-7 demostró enlace de CEACAM (Fig. 13) pero no de 6-8 (Fig. 14).

C: Fragmentos D-8 y D-7 producidos por el sistema pQE30

Se encontró que ambos fragmentos de rUspA1 D-8 (Fig. 15) y D-7 (no mostrado) se enlazaron a CEACAM1.

Actividad Biológica del péptido recombinante 4-7

La cepa MX1 de *M. catarrhalis* y la cepa Rd de *H. influenzae* se enlazan a las células de Ovario de Hámster Chino (CHO) transfectadas con CEACAM1. Su enlace puede ser bloqueado con el péptido recombinante 4-7 de UspA1 de *M. catarrhalis*, pero no a un péptido de control (Fig. 17).

En un experimento adicional se mostró que el péptido recombinantes D-7 (pero no el recombinante 6-8, i.e., residuos E659-K863 de UspA1 de MX2) inhibe el enlace de cepas homólogas o heterólogas a células CHO transfectadas que expresan CEACAM1 (Fig. 23). Seguido de la incubación de células ya sea sin péptido (columna 1), con péptido de control ($2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; columna 2), o D-7 ($2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; columna 3), se agregaron bacterias y las bacterias no adherentes se removieron mediante lavado después de 1h de incubación. Las bacterias asociadas con células fueron entonces detectadas usando antisuero elevado contra distintas cepas y anticuerpos secundarios

conjugados con rodamina. Mx: *Moraxella catarrhalis*, Nm: *Neisseria Meningitidis*; Hi: *Haemophilus influenzae*.

Ejemplo 5. Caracterización de los péptidos que se enlazan a CEACAM1

Se encontró que el péptido D-7 era el péptido recombinante de enlace más fuerte. Por lo tanto, la región D-7 (142 amino ácidos, ver Fig. 16) de MX2 contiene la información de enlace a CEACAM1.

El péptido truncado 4-T (197 amino ácidos) retiene enlace débil (Fig. 13). Por lo tanto la región D-T puede contener una región con habilidad de enlace a CEACAM1.

Se encontró una sustitución de amino ácido simple, K 560 I, en D-7 para abolir casi todo el enlace a CEACAM1.

La eliminación de la región 571-632 en el péptido D-8 (D-8Δ) produjo una pérdida del enlace a CEACAM1.

Se hicieron y probaron péptidos de superposición lineal que guardan la región D-T (Fig. 19) para su habilidad de enlazarse a CEACAM1. No se observó enlace al CEACAM1.

Espectroscopia de dicroísmo circular

El péptido D-7 y el D-7 mutante (K 560 I) fueron analizados mediante espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron a temperatura ambiente usando un espectropolarímetro jobin-Yvon CD6. Los espectros del D-7 recombinante y D-7 (K 560 I) a concentraciones de 0.1 mg/ml se midieron en cubetas de cuarzo. Todos los espectros son promedios de 8 barridas con espectros de amortiguador libre de proteína relevante sustraídos y se graficaron usando Excel (Microsoft Inc.).

Los espectros obtenidos muestran que D-7 tiene una estructura α -helicoidal mientras que D-7 (K 560 I) adopta una formación de espiral

aleatoria (Fig. 18). Sin pretender estar ligado por ninguna teoría, se propone que el enlace a CEACAM1 de UspA1 de Mx requiere una conformación de base α - helicoidal, tal vez una estructura de espiral enrollada.

Resumen

A partir de los resultados descritos anteriormente, los inventores concluyeron que el enlace a CEACAM1 de UspA1 de Mx requiere una región con D-7 además de una conformación de base α -helicoidal, tal vez una estructura de espiral enrollada.

El hallazgo que el dominio de enlace a CEACAM1 de UspA1 de Mx adopta una conformación de base α -helicoidal que es requerida para el enlace del receptor es particularmente interesante. Las proteínas Opa requieren de reconstitución cuidadosa para la presentación de los dominios de enlace a CEACAM que se encuentran en diferentes asas expuestas de superficie. Los hallazgos presentes sugieren que D-7 se repliega espontáneamente para proveer la propiedad de enlace a CEACAM. En D-7 la estructura enrollada provee una estructura de sub-unidad globular con conformación apropiada para el enlace a CEACAM1. Esta propiedad ventajosa del péptido D-7 significa que el péptido, y derivados, homólogos o fragmentos del mismo, podrían tener utilidad particular como una vacuna o terapéutico de sub-unidad. Los derivados del péptido D-7 que tienen la conformación en base α -helicoidal requerida pueden ser identificados mediante el espectro de dicroísmo circular de "huella" única.

Ejemplo 6. Análisis de Secuencia

Una alineación de la región de D-7 de las secuencias de amino ácido de las proteínas UspA1 de diez cepas de Mx se muestra en la Figura 20.

Seis de diez cepas son idénticas sobre la región secuenciada. Las cepas MX3 y MX4 son 100% idénticas sobre la secuencia disponible de la región D-7 y tienen las identidades globales 90.85% y 88.03% respectivamente, teniendo en cuenta los residuos de aminoácido 13 y 17 del terminal N para MX3 y MX4 respectivamente, que no han sido determinados.

Las dos cepas restantes TTA37 y O35E tienen eliminaciones como se muestran (Fig. 20) que se encuentran dentro de la región D-T. La identidad global incluyendo los espacios en D-7 es 70.4% y 50% respectivamente. TTA37 es idéntica en la región restante de 100 amino ácidos mientras que O35E es idéntica en 71 de 72 aminoácidos cuando se alinean manualmente (Fig. 21). Se sabe que O35E no se enlaza a CEACAM1. TTA37 no está disponible para ensayos.

Ejemplo 7. Propiedades de bloqueo de adhesión de D-7

Resultados

El potencial de D-7 como un agente anti-adhesivo efectivo contra cepas homólogas y heterólogas de Mx, Nm, Ng y Hi fue primero examinado usando el receptor soluble CEACAM1-Fc. El (CC1-Fc) fue preincubado con D-7 antes de extender los lisatos de célula entera de dos cepas de Mx salpicada en nitrocelulosa. Se mostró que el D-7 recombinante inhibe el enlace de CC1-Fc significativamente a una cepa heteróloga MX1 y a la cepa homóloga MX2 en una manera dependiente de la dosis (Fig. 24 a). La inhibición fue significativa y pareció alcanzar una meseta por encima de $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. No se mostró tal inhibición con el péptido de control (D-8Δ), previamente mostró que no se enlazaba a CEACAM1 (Ejemplo 5). Además, se determinó la inhibición de múltiples cepas bacterianas. La mayoría de las cepas usadas representaban aislados clínicos de orígenes alrededor del mundo (ver Métodos). Se mostró la inhibición significativa y específica por D-7 pero no por (D-8Δ) (Figura 24b). El efecto de bloqueo de D-7 fue entonces examinado usando células de Ovario de Hámster Chino (CHO) trasfectadas con CEACAM1 (CHO-CEACAM1). Como con el receptor soluble, se observó una inhibición de enlace de Mx, Nm y Hi a células CHO-CEACAM seguida de la preincubación con D-7 pero no con el péptido de control (Fig. 25, a y b). La inhibición del enlace bacteriano a células CHO-CEACAM1 era dependiente de la dosis y significativo en o por encima de $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para Mx y Hi y $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para Nm (Figura 25 b). La abolición casi completa de enlace bacteriano a CHO-CEACAM1 se obtuvo a concentraciones de c. $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Fig. 25 a y b). Los valores obtenidos para inhibición tentativamente sugieren un orden de afinidad para las interacciones de CEACAM de las bacterias usadas en este estudio de

Nm>Mx>Hi. Además de CEACAM1, se ha mostrado que la *N. meningitidis* marca otros miembros de la familia CEACAM, incluyendo CEA y CEACAM6 epiteliales (NCA) ⁹, este es el caso también de alcuzas cepas de Mx, las cepas de Hi tienen a marcar CEACAM1 como un receptor preferido (datos no mostrados). Seguida de la preincubación con D-7 (2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), se observó la inhibición de enlace Nm a células HeLa transfectadas que expresan CEACAM1, 6 y CEA (Figura 25 c).

La eficacia de D-7 se probó adicionalmente usando HeLa-CC1H, una línea celular generada para expresar niveles altos de CEACAM1 para imitar, en parte, un posible estado de inflamación *in vivo* de células epiteliales. La densidad de receptor alta permite que las bacterias que expresan Opa se unan a células objetivo a pesar de la presencia de cápsula ⁷. Por lo tanto, este modelo nos permitió también usar un fenotipo de Nm (h18.18) que se puede encontrar *in vivo*, i.e., encapsulado, frimbriado y que expresa las proteínas de membrana exterior Opa así como Opc, ^{15, 25}. Primero se probó el enlace de un derivado deficiente en Opa de h18.18 a HeLa-CC1H, y se encontró que era relativamente bajo (10-20 bacterias por célula) y se debió a la expresión de pili (fimbrias). Como se esperaba, la adherencia de h18.18 a HeLa-CC1H fue muy mejorado (100-150 bacterias por célula) y a pesar de la contribución de Pili (fimbrias), la adhesión células de h18.18 fue reducida considerablemente mediante el tratamiento previo o simultáneo con D-7 (Fig. 25, d). Además de lo anterior, D-7 se probó en la línea celular A549 epitelial pulmonar, conocida por expresar CEACAMs ²⁶. Esta línea celular se eligió porque también expresa los receptores para otros ligandos de Mx ²⁷, así se podría probar la eficacia del D-7 para reducir la carga bacteriana. En la presencia de D-7 (2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) pero no D-8 Δ , se observó una disminución dramática en la interacción de Nm y Hi con las células A549 (Figura 25, e). También se observó la reducción de enlace para la cepa Mx, y aunque en comparación relativamente menor, fue no obstante significativa (Fig. 25, e).

Métodos

Aislados y cultivos bacterianos

La Mx y Nm fueron cultivadas en agar BHI complementado con sangre de caballo calentada al 10%, mientras que las Hi fueron cultivadas en agar de infusión de corazón cerebro (BHI) complementado con base Levinthal. Las cepas de Ng se cultivaron en agar GC. Todas las bacterias se cultivaron a 37 °C por hasta 16 h en un incubador con CO₂ al 5%. Las cepas de Mx eran aislados clínicos obtenidos de casos de otitis media y COPD y representan aislados de varios países. Eagan, c1 y f1 son Hi clasificables con cápsulas de tipo b, c y f, respectivamente, Rd es un derivado no encapsulado de la cepa tipo d. Las cepas A930065 y NT1 son NTHi. Las cepas A3, F2037, F3035 y F1947 son aislados del biogrupo aegyptius de Hi. Los aislados de Nm C751A, C751B y C751D son tres aislados distintos que expresan Opa de una cepa C751 de serogrupo A. Los otros aislados fueron de los siguientes serogrupos: PMC17(A), C311 y MC58 (B), y C114 (C) PMC2 (29E), PMC4 (W135) y PMC10 (Y). Los aislados de Ng P9-13, 16 y 35 son variantes Opa intra-cepa de la cepa P9 y los otros aislados clínicos eran de origen mundial. La mayoría de las cepas empleadas en el estudio actual han sido mejor descritas antes ^{10, 26, 28}.

Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal de ratón anti-poli histidina se compró en Qiagen y se usó a 0.2 µg·mL⁻¹. El antisuero policlonal contra las cepas Mx, Nm y Hi se elevó en ratones usando protocolos estándar y lisatos de célula entera de múltiples cepas como antígenos. El anticuerpo anti-UspA1 (R38) usando en este estudio se ha descrito en el Ejemplo 1 y ²⁶. El antisuero policlonal contra D-7 fue generado en ratones mediante inmunización con péptido enlazado a resina Ni-NTA (Qiagen; 100-200 µg de péptido por inmunización). El complemento fue inactivado mediante calentamiento del antisuero a 56°C por 30 min. Los anticuerpos anti-D-7 fueron purificados de afinidad usando péptido D-7 acoplado a columna AminoLink Plus de acuerdo con el protocolo del fabricante (Pierce).

Construcciones de receptor soluble & líneas celulares

Las células de CEACAM1-Fc solubles y CHO transfectadas con CEACAM1 usadas en este estudio han sido descritas previamente ^{11, 19}. Las

células HeLa que expresan un rango de moléculas de CEACAM fueron un obsequio del Profesor Wolfgang Zimmerman (Universidad de Munich, Alemania) y del Dr. Scout Gray-Owen (Universidad de Toronto, Canadá) y se cultivaron en RPMI 1640 que contiene 10% de suero de ternero fetal (FCS). Las células de carcinoma pulmonar humano A549 (Flor Laboratorios) fueron cultivadas en medio de Ham F12 que contiene 10% de (FCS). Las células HeLa que expresan niveles altos de CEACAM se generaron usando el sistema de expresión de gen Tet-On™ (Clontec) usando Gifugeno-6 (Roche). Los transfectantes fueron seleccionados usando 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de higromicina. Aquellos transfectantes que eran positivos para la expresión de CEACAM se seleccionaron usando FACS y limitando la dilución. El clon HeLa-CC1H en la presencia de 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de doxiciclina produjeron los niveles más altos del receptor.

Ensayos de extensión del receptor

Estos experimentos se basaron en un método descrito previamente⁹, con las siguientes excepciones. Para los estudios de inhibición, el CEACAM1-Fc (0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) fue preincubado con D-7 o péptido de control (0.001-2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) por 1 h a TA. Las manchas fueron posteriormente extendidas ya sea con CEACAM1-Fc (0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) solo o preincubado con péptidos como se describió. Alternativamente, las manchas fueron extendidas con anticuerpo anti-D-7 de conejo purificado (10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) por 1 h antes de extenderlas con receptor (0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). En cualquier caso se determinaron los niveles de enlace del receptor mediante análisis densitométrico usando el programa NIH Scion Image.

Inhibición de la adherencia bacteriana a células que expresan CEACAM por el péptido D-7.

Monocapas concluentes de células fueron preincubadas con péptido D-7 o péptido de control (0.1-2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) por 30-60 min a 37 °C en medio 199 con la adición de suero fetal bovino al 2%. Las monocapas fueron examinadas después de la preincubación con péptido para asegurar que no había ocurrido ningún efecto nocivo en las células. Posteriormente, las monocapas fueron incubadas a una relación de c. 100-200 bacterias por

célula en medio 199 con la adición de suero fetal bovino al 2% por 1h a 37 °C. Las bacterias no adherentes fueron removidas lavando 4 veces con medio 199 y las monocapas fueron entonces tratadas para detección de inmunofluorescencia o lisadas con 1% de saponina y diluciones de bacterias puestas en placa para la determinación de unidades formadores de colonia (cfu) como se describió previamente ²⁵. Para la detección de inmunofluorescencia, las células fueron fijadas en metanol absoluto por 10 min., lavadas y bloqueadas con albúmina de suero bovino al 1% en PBS que contiene 0.05% de Tween por 1h. Las bacterias unidas fueron detectadas usando antisuero anti-bacteriano y anticuerpos secundarios conjugados con rodamina. Los números de bacterias que se adhieren a las células que expresan HeLa-CEACAM se obtuvieron por conteo directo usando un microscopio Olympus IX70, con amplificación X400. Se obtuvieron los valores medios de bacterias enlazadas después del conteo de bacterias adherentes a 20 células elegidas aleatoriamente de experimentos duplicados. La adherencia bacteriana a HeLa-CC1H se determinó mediante análisis de cfu como de describió anteriormente.

Ejemplo 8. El anticuerpo anti-D7 Inhibe las interacciones de Mx-CEACAM1

Resultados

El antisuero de conejo generado contra D-7 contenía anticuerpos que reaccionan cruzadamente con UspA1 de varias cepas de Mx en la extensión de manchado Occidental de lisatos de célula entera (datos no mostrados). No se observó enlace de anti-D-7 a Opa de Nm o P5 de Hi por el manchado Occidental usando anticuerpos purificados de afinidad (datos no mostrados). La incubación de lisatos de célula entera de un rango de cepas de Mx con anti-D-7 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) antes de la extensión de CC1-Fc produjo una inhibición significativa del enlace del receptor con la mayoría de las cepas que muestran inhibición mayor al 80% (Fig. 26). Sin embargo, solamente se observaron niveles bajos de inhibición para cepas de Hi, Nm y Ng en experimentos similares. Así, los anticuerpos contra D-7 podrían ofrecer protección contra la infección por Mx mientras que D-7 puede servir como un

péptido anti-microbiano más general para un diverso rango de bacterias que marcan CEACAM.

Ejemplo 9. Inhibición de la adherencia bacteriana a células endoteliales humanas que expresan CEACAM por el péptido D-7

Con el fin de evaluar el efecto de D-7 en células endoteliales se usaron monocapas confluentes de células HMEC-1. Las células endoteliales microvasculares humanas fueron preincubadas con ya sea D-7 o una molécula de control recombinante (ambas a 1 µg·ml⁻¹) por 60 min. Las bacterias (aislado que expresa OpaD de cepa C751 de *N. meningitidis*) fueron entonces agregadas a una relación de infección de 100 bacterias por célula y se incubaron por 11h a 37 °C. Después de este tiempo, las bacterias no adherentes fueron removidas mediante lavado y la monocapa fijada en metanol por 10 min a temperatura ambiente. Las bacterias adherentes se detectaron mediante extensión con antisuero policlonal de conejo contra *N.meningitidis* y posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con TRITC.

La mayoría de las células endoteliales tenían hasta 30 bacterias asociadas por célula en la ausencia de péptidos. En la presencia de péptido de control no se observó inhibición obvia del enlace bacteriano. Sin embargo, en la presencia de D-7, el enlace fue virtualmente abolido con células esporádicas que tienen 1-2 bacterias unidas (Fig. 27).

Así, D-7 es capaz de inhibir la adhesión mediada por Opa-CEACAM de *N. meningitidis* a células endoteliales así como a células epiteliales.

Ejemplo 10. Conservación de la secuencia de fragmento "4-T" (amino ácidos 427-623 de Uspa1 de MX2) entre secuencias de proteína UspA1

Tabla II. Cepas y secuencias usadas

<u>Número de acceso</u> <u>GenBank</u>	<u>Cepa</u>	<u>Longitud (aa)</u>
<u>AAN84895</u>	<u>P44</u>	<u>913</u>

<u>AAB96359</u>	<u>O35E</u>	<u>832</u>
<u>AAF40122</u>	<u>TTA37</u>	<u>873</u>
<u>AAF40118</u>	<u>O12E</u>	<u>922</u>
<u>AAF36416</u>	<u>O46E</u>	<u>892</u>
<u>AAD43469</u>	<u>V1171</u>	<u>912</u>
<u>AAD43467</u>	<u>TTA24</u>	<u>941</u>
<u>AAD43465</u>	<u>ATCC25238 (MX2)</u>	<u>863</u>

Se hizo una alineación múltiple con un todas las secuencias de proteína de longitud total para identificar el fragmento correspondiente en las secuencias de otras cepas.

Tabla III. Ubicación del fragmento correspondiente

<u>Cepa</u>	<u>De aa</u>	<u>A aa</u>	<u>Longitud</u>
<u>ATCC25238</u>	<u>427</u>	<u>623</u>	<u>197</u>
<u>O12E</u>	<u>515</u>	<u>682</u>	<u>168</u>
<u>O35E</u>	<u>495</u>	<u>592</u>	<u>98</u>
<u>O46E</u>	<u>456</u>	<u>652</u>	<u>197</u>
<u>P44</u>	<u>477</u>	<u>673</u>	<u>197</u>
<u>TTA24</u>	<u>505</u>	<u>701</u>	<u>197</u>
<u>TTA37</u>	<u>486</u>	<u>633</u>	<u>148</u>
<u>V1171</u>	<u>476</u>	<u>672</u>	<u>197</u>

La alineación múltiple de estos fragmentos se muestra en la Figura 28. Los porcentajes de identidad asociados se muestran a continuación.

Tabla IV. Porcentaje de Identidad de secuencia de los fragmentos definidos en la Tabla III.

	<u>O12E</u>	<u>O35E</u>	<u>O46E</u>	<u>P44</u>	<u>TTA24</u>	<u>TTA37</u>	<u>V1171</u>
<u>ATCC25238</u>	<u>95</u>	<u>85</u>	<u>96</u>	<u>99</u>	<u>96</u>	<u>97</u>	<u>97</u>
<u>O12E</u>		<u>92</u>	<u>95</u>	<u>96</u>	<u>95</u>	<u>79</u>	<u>94</u>
<u>O35E</u>			<u>90</u>	<u>86</u>	<u>91</u>	<u>89</u>	<u>89</u>

<u>O46E</u>				<u>97</u>	<u>98</u>	<u>98</u>	<u>98</u>
<u>P44</u>					<u>97</u>	<u>97</u>	<u>97</u>
<u>TTA24</u>						<u>98</u>	<u>98</u>
<u>TTA37</u>							<u>98</u>

Como se muestra en el Ejemplo 6 para la región D-7, los resultados anteriores indican que la región 4-T está altamente conservada entre diferentes cepas, con identidad de secuencia del 95% o más para todas las cepas probadas excepto O35E (85% de identidad). Como se notó previamente, la O35E no se enlaza a CEACAM. En consecuencia, los péptidos que comprenden o consisten de regiones conservadas de la secuencia 4-T (427-623), como se muestra en la Figura 28, son péptidos preferidos de acuerdo con la invención con utilidad para el tratamiento o profilaxis de enfermedades, en particular enfermedades en donde los receptores CEACAM están implicados.

Referencias:

1. Cartwright et al. 1995. En *Meningococcal Disease*. John Wiley & Sons.
2. van Alphen, L. & van Ham, S.M. 1994, *Rev Med Microbiol* 5:245.
3. Foxwell, A. R. et al. 1998. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:294.
4. van Alphen L. et al. 1995. *Am J Respir Crit Car Med* 151:2094.
5. Karalus, R. et al. 2000. *Microbes & Infection* 2:5.
6. Kraft, M. 2000. *Clin Chest Med* 21:301.
7. Virji, M. et al. 1996. *Mol Microbiol* 22:929.
8. Virji, M. et al. 1996. *Mol Microbiol* 22:941.
9. Virji, M. et al. 1999. *Mol Microbiol* 34:538.
10. Virji, M. et al. 2000. *Mol Microbiol* 36:784.
11. Hill, D. et al. 2001 *Mol Microbiol* 39:850.
12. Hammarström, S. 1999 *Cancer Biol* 9:67.
13. Stephens, D. S. 1989. *Clin Microbiol Rev* 2:S104.
14. Virji, M. et al. 1991. *Mol Microbiol* 5:1831.
15. Achtman, M. 1995 *Trends Microbiol* 3:186.
16. Merz, A. J. & So, M. 2000 *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:423.

17. Woods, J.P. & Cannon, J. G. 1990 *Infect Immun* 58:569.
18. Wang, L-F & Yu, M. 1996, *En Methods Mol Biol* 66:269 (Morris, G.E. ed). Humana Press.
19. Colman-Lerner. 2000. *Trends Guide* p.56 (Wilson, E. ed.).
20. Beauchemin, N., et al., 1999 *Exp Cell Res* 252: 243-249.
21. Boulton I.C. & Gray-Owen S.D. 2002 *Nat Immunol* 3(3):229-36.
22. Chen T. et al., 2001 *J Leukoc Biol* 70(2):335-40.
23. Lafontaine, E.R., et al., *J Bacteriol* 182:1364-1373.
24. Virji, M. 2001 *Trends in Microbiol*, 9:258-259.
25. Virji, M. et al. 1995. *Mol Microbiol* 18:741-754.
26. Hill, D.J. & Virji, M. 2003. *Mol Microbiol* 48: 117-129.
27. Hola, M.M., et al. 2004. *Infect Immun*. 72: 1906-1913.
28. Virji, M. et al. 1990. *Microb Pathog* 9: 441-450.
29. Langermann, S. et al. 1997. *Science* 273: 607-611.
30. Ofek, I. et al. 2003. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38: 181-191.
31. Simon, P.M. et al. 1997. *Infect Immun* 65: 750-757.
32. Indapaan-Heikkili, I. et al. 1997. *J Infect Dis* 176: 704-712.
33. Nelly, G.C. et al. 1999. *Nat Biotechnol* 17: 42-47.
34. Gan, B.S. et al. 2002. *J Infect Dis* 185: 1369-1372.
35. Reid, G. & Burton, J. 2002. *Microbes Infect* 4:319-324.
36. Pinyon, R.A. et al. 2004. *J Infect Dis* 189; 1547-1555.
37. Reid, G. et al. 2001. *Trends Microbiol* 9: 424-428.
38. Toleman, M. et al. 2002. *Cell Microbiol* 3:33-44.
39. Budt, M. et al. 2002. *Biol Chem* 383:803-812

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende o consiste de una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de: residuos 527 a 623 de la secuencia mostrada en la Figura 6, y las secuencias conservadas identificadas en la alineación de secuencia mostrada en la Figura 28.

2. Un polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la secuencia conservada se selecciona del grupo que consiste de

QHSSDIKTLK,
NVEEGLLDLSGRLIDQKADLTCDIK,
NVEEGLLDLSRGLIDQKADIAKNQA,
DIAQNQT,
DIQDLAAYNELQD,
QTEAIDALNKASS,
TAELGIAENKKDAQIAKAQANENKDGIAK,
NQADIQLHDKKITNLGILHSMVARAVGNNTQGVATNKADIAK,
NQADIANNIKKNYELA,
NQADIANNI, y
NYELA.

3. Un polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, que es una proteína UspA1 truncada.

4. Un polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se enlaza a los receptores CEACAM.

5. Un medicamento que comprende el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglutinantes, portadores o preservativos farmacéuticamente aceptables.

6. El uso de un medicamento de acuerdo con la reivindicación 5 para el tratamiento o profilaxis de la infección.

7. El uso de un medicamento de acuerdo con la reivindicación 5 para el tratamiento o prevención de una enfermedad en la cual los receptores CEACAM están involucrados.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7 para el tratamiento o prevención de infección, enfermedad respiratoria, enfermedades neoplásicas y condiciones asociadas con enfermedades neoplásicas, angiogénesis, caries dental y enfermedad periodontal.
9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la infección es de, o ha ocurrido mediante una membrana mucosa.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la infección es causada por *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* o *Moraxella catarrhalis*.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la infección es causada por *Fusobacterium nucleatum*.
12. El uso de un medicamento de acuerdo con la reivindicación 5 para la profilaxis o tratamiento de otitis media.
13. El uso de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en un ensayo de selección para la identificación de reactivos de bloqueo novedosos para uso como agentes terapéuticos, que comprende la selección de agentes terapéuticos potenciales por su habilidad para imitar, o por su homología a dicho polipéptido.
14. Una vacuna que comprende un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglutinantes, portadores o preservativos farmacéuticamente aceptables.
15. Un método para tratar o prevenir la infección en un individuo en necesidad de este, que comprende la administración de una cantidad efectiva de un medicamento según la reivindicación 5.

16. Un polipéptido sustancialmente como el descrito aquí con referencia y como se ilustra en la Figura 6 de los dibujos acompañantes.

17. Un medicamento sustancialmente como el descrito aquí, que comprende el polipéptido de la reivindicación 16.

18. El uso de un ligando de enlace del receptor CEACAM en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad, en la cual los receptores CEACAM están involucrados, en el marcado celular del patógeno que causa la enfermedad, en donde el ligando comprende o consiste de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de los residuos 527 a 623 de la secuencia mostrada en la Figura 6 y secuencias conservadas identificadas en la alineación de secuencia mostrada en la Figura 28, o un fragmento o equivalente funcional de la misma que retiene la habilidad de enlace CEACAM.

19. El uso según la reivindicación 18, en donde la secuencia conservada se selecciona del grupo que consiste de:

QHSSDIKTLK,
NVEEGLLDLSGRLIDQKADLTCDIK,
NVEEGLLDLSRGLIDQKADIAKNQA,
DIAQNQT,
DIQDLAAYNELQD,
QTEAIDALNKASS,
TAELGIAENKKDAQIAKAQANENKDGIAK,
NQADIQLHDKKITNLGILHSMVARAVGNNTQGVATNKADIAK,
NQADIANNIKKNIYELA,
NQADIANNI, y
NIYELA.

20. El uso de acuerdo con la reivindicación 18 o reivindicación 19, en donde la enfermedad es seleccionada del grupo consistente de infección, enfermedad respiratoria, enfermedad neoplásica y condiciones asociadas con enfermedad neoplásica, angiogénesis, caries dental y enfermedad periodontal.

21. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 18 a 20, en donde el patógeno infecta o entra por medio de una membrana mucosa.

22. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 18 a 20, en donde el patógeno que causa la enfermedad se selecciona del grupo que consiste de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*.

23. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en donde el patógeno que causa la enfermedad es *Fusobacterium nucleatum*.

24. El uso de acuerdo con la reivindicación 22 o 23, en donde la enfermedad es otitis media.

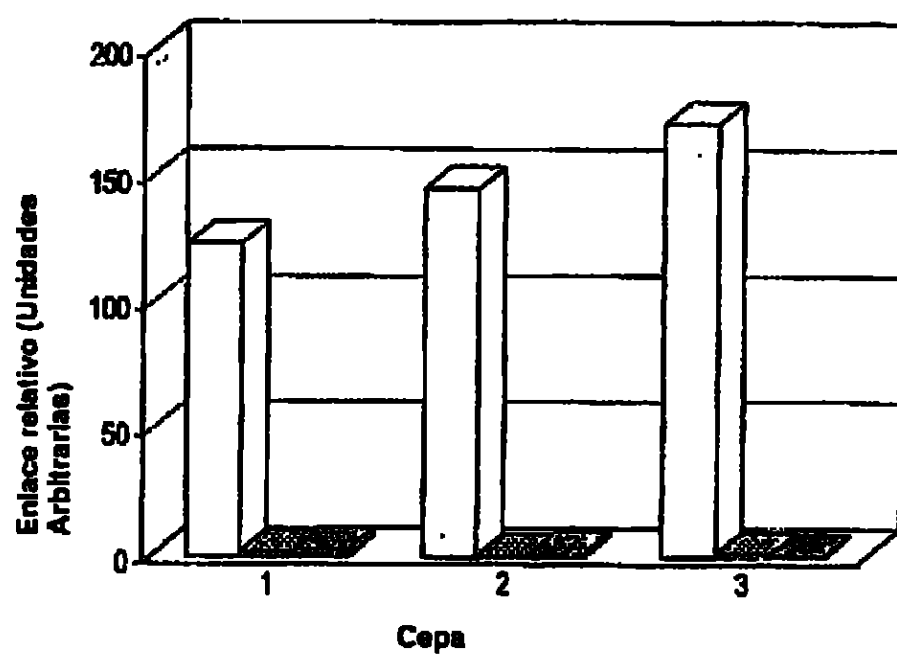


FIGURA 1

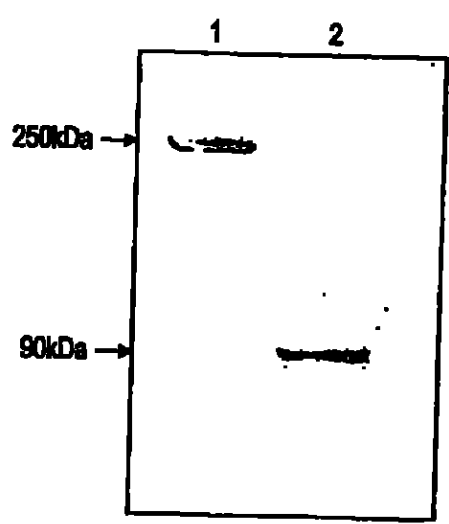


Figura 2

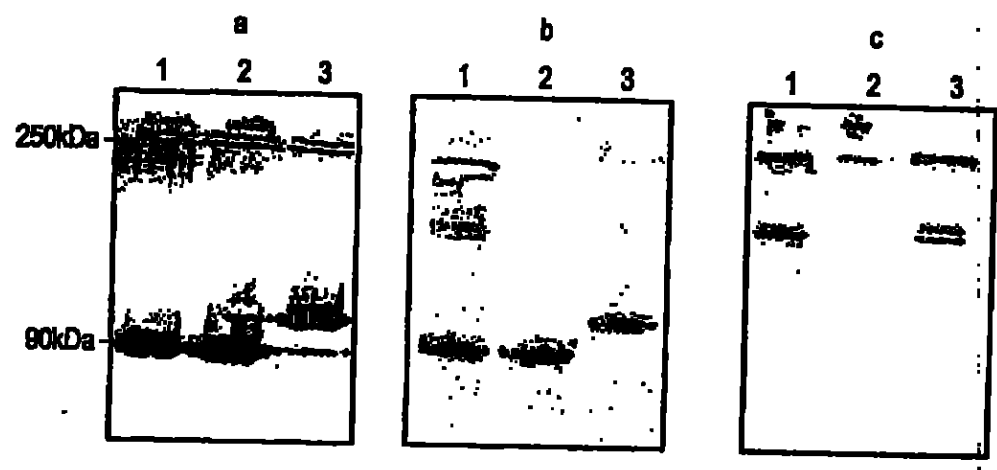


Figura 3

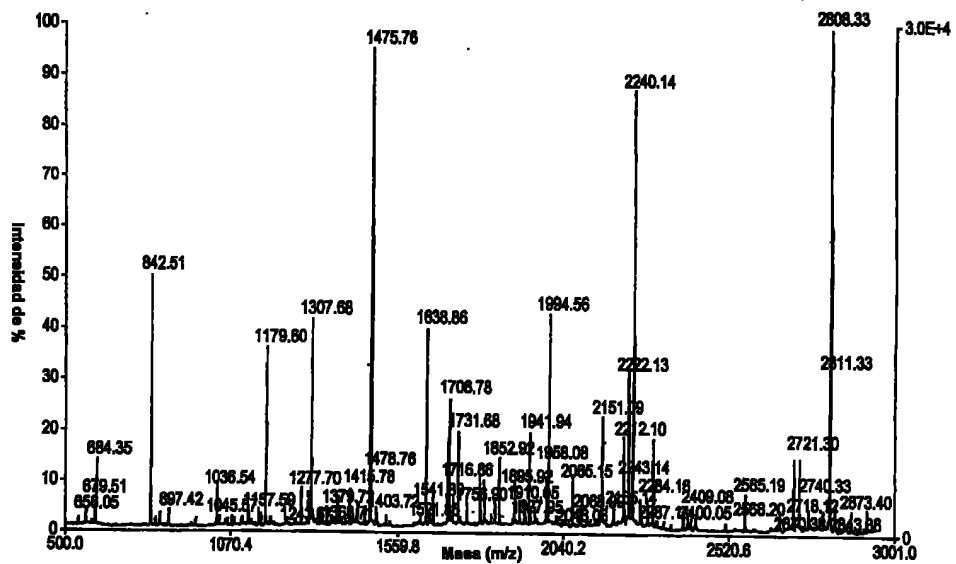


Figura 4a

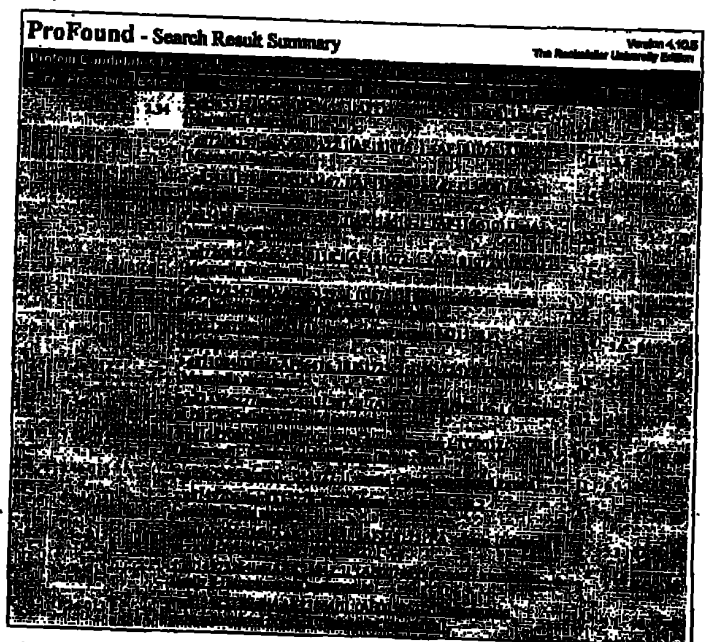


Figura 4c



Figura 5

¹MNKTYYKKNAAGHLVACSEFAKGHTKKAVLGSLLVGILGMATTASQKV GKATNKISGGDNNTANGTYLYIGGGDY⁷⁰
⁷⁰NKTKGRYSTIGGGGLFNEATNEYSTIGSGGYNKAKGRYSTIGGGGYNEATNQYSTIGGGDNNTAKGRYSTIGGGGYNEAT¹⁴⁰
¹⁴⁰ENSTVGGGGYNQAKGRNSTVAGGYNNEATGTDSTIAGGRYKQATGKGSFAAGIDNKAHADNAVALGNKNTIEGENSYA²¹⁰
²¹⁰IGSNNTYKKGGQNNVFLGSNTDTTNAQNGSVLGHNITAGKAATMNSAEVGGLSLTGFAGASKTGNGTVSVGKKGKERO²⁸⁰
²⁸⁰VHVGAQEISDSTDAVNGSOLHALATVWAQNKADIKOLDDEVGLGEEINSLEGEIENQDAIAKNOADIKTESNVEEG³⁵⁰
³⁵⁰LLDLSGRLLDOADIDNNINMIYELAQOQDOHSSDIKTUKNNVEEGLLDLSGRLLDOKACLTOKIKALESNVEEGLLDLSGRLL⁴²⁰
⁴²⁰DOKADIAKNOADIAQNOTDIQDLAAYNELODAYAKQOTEADALNKASSANTDRIATAELGIAENKKDAQIAKAOANEN⁴⁹⁰
⁴⁹⁰KDGIKNOADIQLHDKKITNLGILHSMVARAVGNNTGGVATNKADIAKNOADIANWKNMIYELAQOQDOHSSDIKTAK⁵⁶⁰
⁵⁶⁰YSAANTDRIAKKAEADASFETLTKNONTIEQGEALVEONKAINDELEGFAAHADVQDKOILQNOADITTNKTAIEONIN⁶³⁰
⁶³⁰RTVANGFEIEKNKAGIATNKOELIIONDRINRINETNNHQDOKIDOLGYALKEQOQHFNHRISAVFROTAGGIANAIATL⁷⁰⁰
⁷⁰⁰PPSRAGEHHVLEGGSYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGYGGSYRWL⁷⁷⁰

Figura 6

69

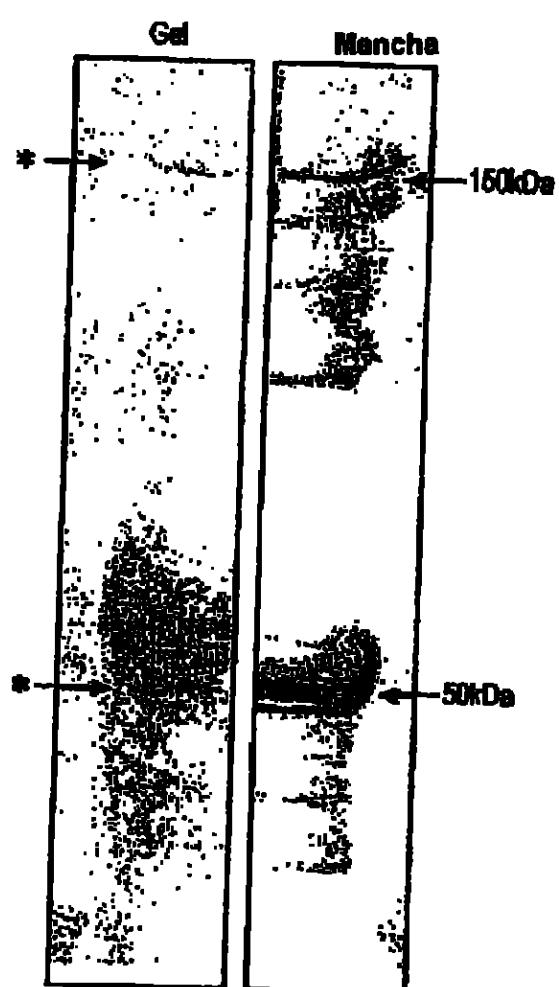


Figura 7

453 ALESNVEEGLDLSGRL 481
421 DQKADIAKNQADIAQNQTDIQDLAAYNELQDAYAKQTEAIDALNKASSANTDRIATAELGIAENKQDAQIAKAQANEN 458
500 KQGIKKNQADIQLDKKTNLGILHSMVARAVGNNTQGVATNKADIAKNQADIANNIKNIYELAQOQDQHSSDIKTLAK 538
638 VSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKNQNTLIEQGEALVEONKAINQELGFAAHADVQDKQILQNOADITTNKTAIEQNIN 719
720 RTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILQNDRLNRINEITNNHQQKIDQLGYALKEQGQHNNRISAVERTAGGIANAJAATL 801
802 PSPSRAGEHIVLFGSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK 833

FIG. 8

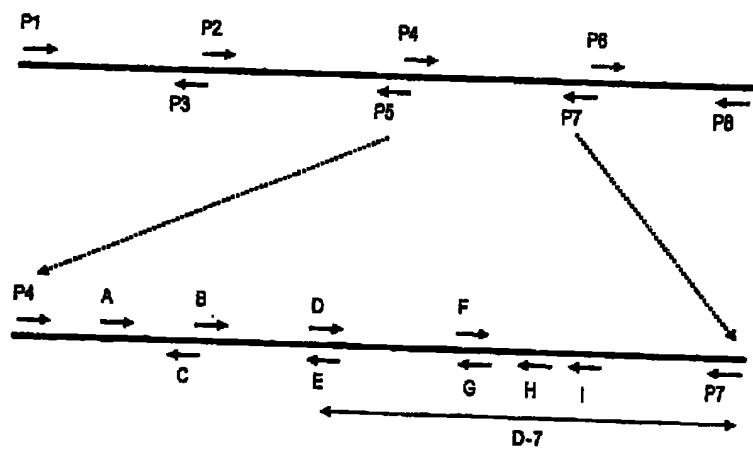


Figura 9

427QHSSDIKTLKNNVEEGLDLSGRLLDQKADLTQDIKALSNVEEGLDLSGRLL459
481DQKADIKNQADIAQNQTDIQDLAAYNELODAYAKQOTEIDALNKASSANTDRIATAELGIAENKKDAQIAKAQANEN509
550KQGIKNQADIQDLHDKKITNLGILHSMVARAVGNNTQGVATNKADIKNQADIANNKNIYELAQQQDQHSSDIKTLAK578
636VSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKNQNTL668

↑
T

Figura 10

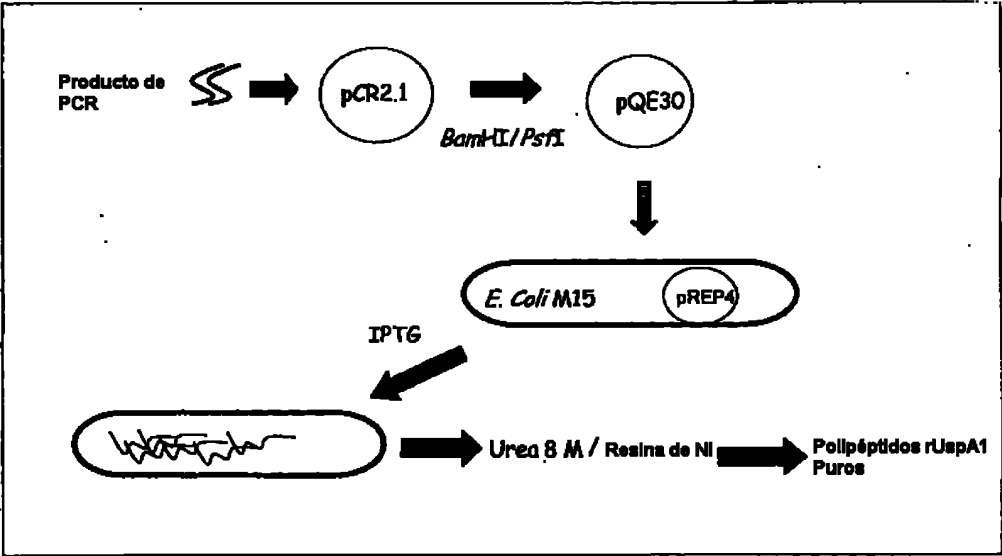


Figura 11

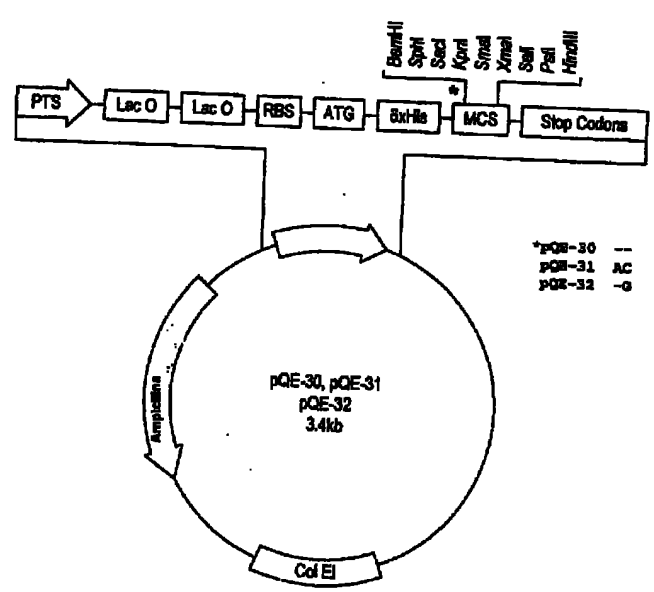


Figura 12

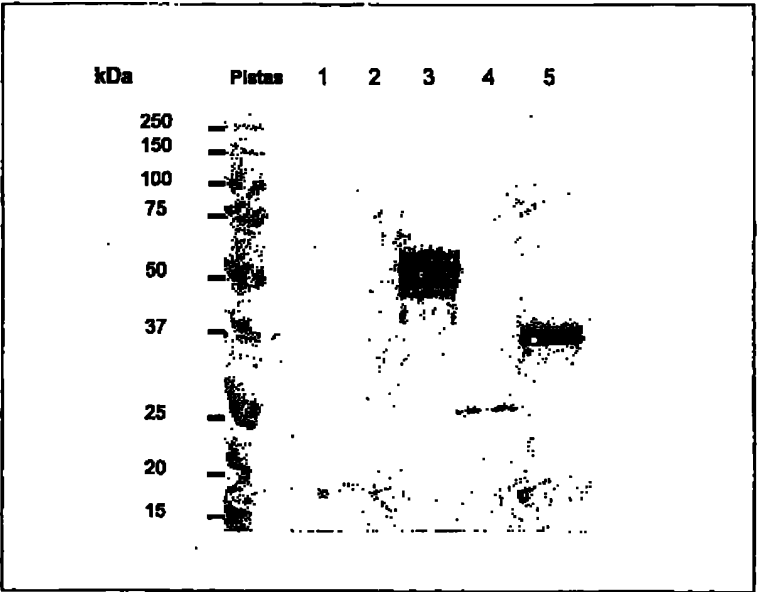


Figura 13

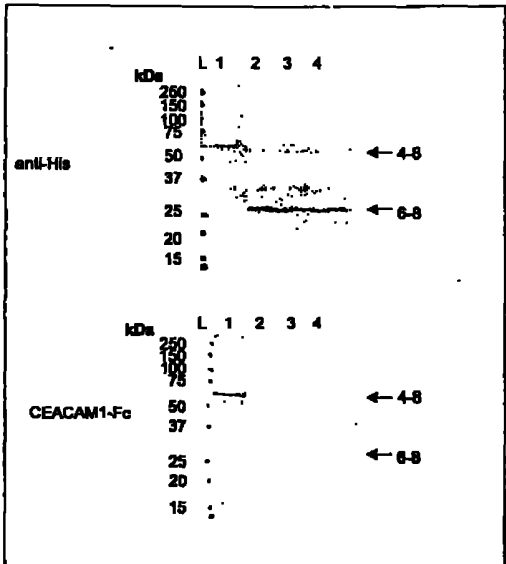


Figura 14

marcadores L1 L2 L3

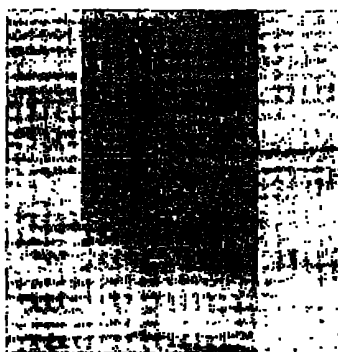
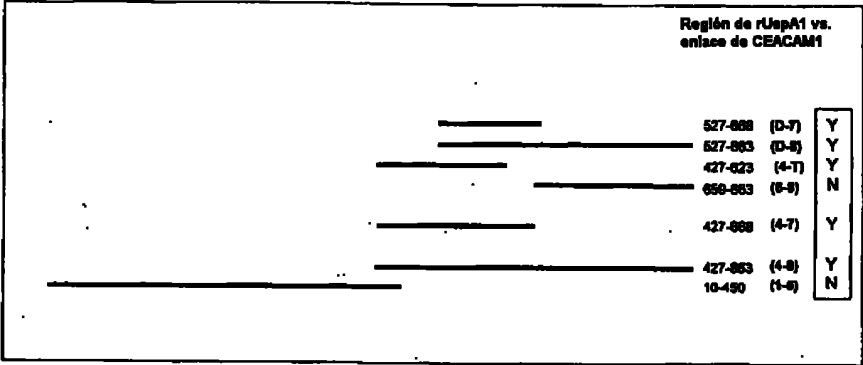


Figura 15



Fragments y PMA predichos (kDa)

D-7	c. 15
D-8	36
4-T	21
6-8	22
4-7	28
4-8	47
1-5	40

para péptidos recombinantes, ad c. 2 kDa

Figura 16

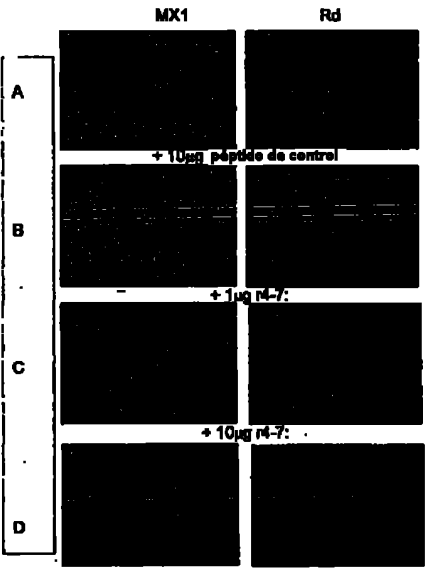


Figura 17

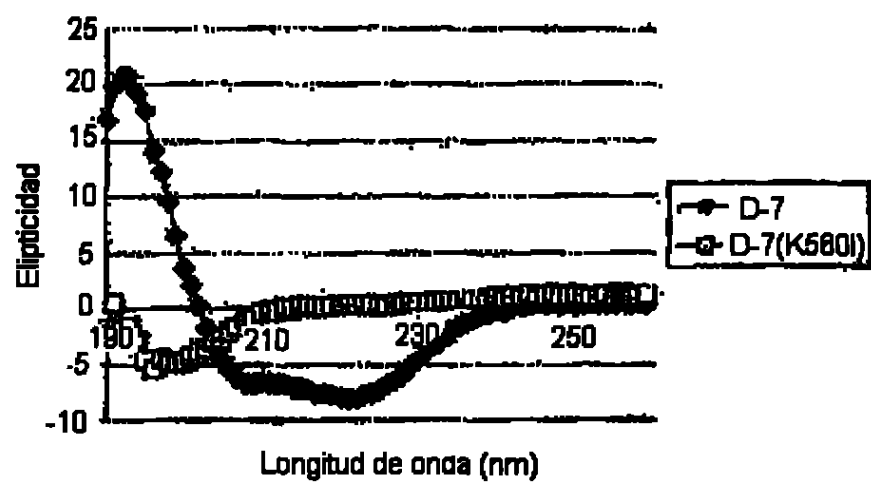


FIG. 18

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

HOJA SUSTITUTA (REGLA 28)

33-meri
a rituratael glaeenkkdaq iakaqanenkk dg
47-mer
enkdglaknqadqldkklnlgilhsnvaravgntqgvalnkad
30-mer
kdaq iakaqanenkk dglaknqadi qilhdkk
peptidos de superposición
q iakaqanenkk dglaknqad
k dglaknqadi qilhdkkln
l qilhdkklni glilhsnvar
l glilhsnvara vgnntqgva
a vgnntqgva nkaqaknq
i nkaqaknqa dlaninkni
otros no enlazantes:
rk dgl
erk dglai

21/29

FIG. 19

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

	A	S	A	N	T	D	R	I	A	T	A	E	L	G	I	X	E	K	K	D	A	Q	I	A	Z	A	Q	A	N	E	N	K	D	G	I	A	K	H	Q	A	D	I	Q	L	F	D	E	X	Mayoritaria		
1	A	S	A	N	T	D	R	I	A	T	A	E	L	G	I	X	E	K	K	D	A	Q	I	A	Z	A	Q	A	N	E	N	K	D	G	I	A	K	H	Q	A	D	I	Q	L	F	D	E	X	TTA24D-7		
1	A	S	A	N	T	D	R	I	A	T	A	E	L	G	I	X	E	K	K	D	A	Q	I	A	Z	A	Q	A	N	E	N	K	D	G	I	A	K	H	Q	A	D	I	Q	L	F	D	E	X	TTA37D-7		
1	A	S	A	N	T	D	R	I	A	T	A	E	L	G	I	X	E	K	K	D	A	Q	I	A	Z	A	Q	A	N	E	N	K	D	G	I	A	K	H	Q	A	D	I	Q	L	F	D	E	X	P44D-7		
1	A	S	A	N	T	D	R	I	A	T	A	E	L	G	I	X	E	K	K	D	A	Q	I	A	Z	A	Q	A	N	E	N	K	D	G	I	A	K	H	Q	A	D	I	Q	L	F	D	E	X	O12ED-7		
1	A	S	A	N	T	D	R	I	A	T	A	E	L	G	I	X	E	K	K	D	A	Q	I	A	Z	A	Q	A	N	E	N	K	D	G	I	A	K	H	Q	A	D	I	Q	L	F	D	E	X	Q35ED-7		
1	A	S	A	N	T	D	R	I	A	T	A	E	L	G	I	X	E	K	K	D	A	Q	I	A	Z	A	Q	A	N	E	N	K	D	G	I	A	K	H	Q	A	D	I	Q	L	F	D	E	X	Q46ED-7		
1	A	S	A	N	T	D	R	I	A	T	A	E	L	G	I	X	E	K	K	D	A	Q	I	A	Z	A	Q	A	N	E	N	K	D	G	I	A	K	H	Q	A	D	I	Q	L	F	D	E	X	V1171D-7		
1	A	S	A	N	T	D	R	I	A	T	A	E	L	G	I	X	E	K	K	D	A	Q	I	A	Z	A	Q	A	N	E	N	K	D	G	I	A	K	H	Q	A	D	I	Q	L	F	D	E	X	MX3D-7		
1	A	S	A	N	T	D	R	I	A	T	A	E	L	G	I	X	E	K	K	D	A	Q	I	A	Z	A	Q	A	N	E	N	K	D	G	I	A	K	H	Q	A	D	I	Q	L	F	D	E	X	MX4D-7		
	I	T	N	L	G	I	L	H	S	H	V	A	R	A	V	G	N	T	Q	Q	V	A	T	N	K	A	D	I	A	K	N	Q	A	D	I	A	N	M	I	K	N	I	Y	E	L	A	Q	Q	Q	Mayoritaria	
51	I	T	N	L	G	I	L	H	S	H	V	A	R	A	V	G	N	T	Q	Q	V	A	T	N	K	A	D	I	A	K	N	Q	A	D	I	A	N	M	I	K	N	I	Y	E	L	A	Q	Q	Q	TTA24D-7	
40	I	T	N	L	G	I	L	H	S	H	V	A	R	A	V	G	N	T	Q	Q	V	A	T	N	K	A	D	I	A	K	N	Q	A	D	I	A	N	M	I	K	N	I	Y	E	L	A	Q	Q	Q	TTA37D-7	
51	I	T	N	L	G	I	L	H	S	H	V	A	R	A	V	G	N	T	Q	Q	V	A	T	N	K	A	D	I	A	K	N	Q	A	D	I	A	N	M	I	K	N	I	Y	E	L	A	Q	Q	Q	P44D-7	
51	I	T	N	L	G	I	L	H	S	H	V	A	R	A	V	G	N	T	Q	Q	V	A	T	N	K	A	D	I	A	K	N	Q	A	D	I	A	N	M	I	K	N	I	Y	E	L	A	Q	Q	Q	O12ED-7	
12	I	T	N	L	G	I	L	H	S	H	V	A	R	A	V	G	N	T	Q	Q	V	A	T	N	K	A	D	I	A	K	N	Q	A	D	I	A	N	M	I	K	N	I	Y	E	L	A	Q	Q	Q	Q35ED-7	
51	I	T	N	L	G	I	L	H	S	H	V	A	R	A	V	G	N	T	Q	Q	V	A	T	N	K	A	D	I	A	K	N	Q	A	D	I	A	N	M	I	K	N	I	Y	E	L	A	Q	Q	Q	Q46ED-7	
51	I	T	N	L	G	I	L	H	S	H	V	A	R	A	V	G	N	T	Q	Q	V	A	T	N	K	A	D	I	A	K	N	Q	A	D	I	A	N	M	I	K	N	I	Y	E	L	A	Q	Q	Q	Q	MX2D-7
51	I	T	N	L	G	I	L	H	S	H	V	A	R	A	V	G	N	T	Q	Q	V	A	T	N	K	A	D	I	A	K	N	Q	A	D	I	A	N	M	I	K	N	I	Y	E	L	A	Q	Q	Q	Q	V1171D-7
38	I	T	N	L	G	I	L	H	S	H	V	A	R	A	V	G	N	T	Q	Q	V	A	T	N	K	A	D	I	A	K	N	Q	A	D	I	A	N	M	I	K	N	I	Y	E	L	A	Q	Q	Q	Q	MX3D-7
34	I	T	N	L	G	I	L	H	S	H	V	A	R	A	V	G	N	T	Q	Q	V	A	T	N	K	A	D	I	A	K	N	Q	A	D	I	A	N	M	I	K	N	I	Y	E	L	A	Q	Q	Q	Q	MX4D-7
	D	O	N	S	E	D	E	X	Y	L	A	K	V	S	A	A	N	T	P	R	I	A	K	N	K	A	E	A	D	A	S	F	E	T	L	T	K	N	Q	N	T	L	Mayoritaria								
101	D	O	N	S	E	D	E	X	Y	L	A	K	V	S	A	A	N	T	P	R	I	A	K	N	K	A	E	A	D	A	S	F	E	T	L	T	K	N	Q	N	T	L	TTA24D-7								
59	D	O	N	S	E	D	E	X	Y	L	A	K	V	S	A	A	N	T	P	R	I	A	K	N	K	A	E	A	D	A	S	F	E	T	L	T	K	N	Q	N	T	L	TTA37D-7								
101	D	O	N	S	E	D	E	X	Y	L	A	K	V	S	A	A	N	T	P	R	I	A	K	N	K	A	E	A	D	A	S	F	E	T	L	T	K	N	Q	N	T	L	P44D-7								
101	D	O	N	S	E	D	E	X	Y	L	A	K	V	S	A	A	N	T	P	R	I	A	K	N	K	A	E	A	D	A	S	F	E	T	L	T	K	N	Q	N	T	L	O12ED-7								
31	D	O	N	S	E	D	E	X	Y	L	A	K	V	S	A	A	N	T	P	R	I	A	K	N	K	A	E	A	D	A	S	F	E	T	L	T	K	N	Q	N	T	L	Q35ED-7								
101	D	O	N	S	E	D	E	X	Y	L	A	K	V	S	A	A	N	T	P	R	I	A	K	N	K	A	E	A	D	A	S	F	E	T	L	T	K	N	Q	N	T	L	Q46ED-7								
101	D	O	N	S	E	D	E	X	Y	L	A	K	V	S	A	A	N	T	P	R	I	A	K	N	K	A	E	A	D	A	S	F	E	T	L	T	K	N	Q	N	T	L	MX2D-7								
101	D	O	N	S	E	D	E	X	Y	L	A	K	V	S	A	A	N	T	P	R	I	A	K	N	K	A	E	A	D	A	S	F	E	T	L	T	K	N	Q	N	T	L	V1171D-7								
89	D	O	N	S	E	D	E	X	Y	L	A	K	V	S	A	A	N	T	P	R	I	A	K	N	K	A	E	A	D	A	S	F	E	T	L	T	K	N	Q	N	T	L	MX3D-7								
84	D	O	N	S	E	D	E	X	Y	L	A	K	V	S	A	A	N	T	P	R	I	A	K	N	K	A	E	A	D	A	S	F	E	T	L	T	K	N	Q	N	T	L	MX4D-7								

FIG. 20

88

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

ASSANTORIATAXELOIARXKEDAQIAKAQANEMENDIAXN Mayortaria
1 ASSANTORIATAXELOIARXKEDAQIAKAQANEMENDIAXN 1028-7
1 ASSANTORIATAXELOIARXKEDAQIAKAQANEMENDIAXN 035ED-7
QADIQLEDEKLTNLGILNSMVARAVGNHTQGVATNKKADIA Mayortaria
41 QADIQLEDEKLTNLGILNSMVARAVGNHTQGVATNKKADIA 1028-7
6 QADIQLEDEKLTNLGILNSMVARAVGNHTQGVATNKKADIA 035ED-7
KNQADIAHNTNITELAQOQOQESDINKTLAKVSAANTDR Mayortaria
81 KNQADIAHNTNITELAQOQOQESDINKTLAKVSAANTDR 1028-7
12 KNQADIAHNTNITELAQOQOQESDINKTLAKVSAANTDR 035ED-7
IANKKAEADASFSTLKNQNTL Mayortaria
121 IANKKAEADASFSTLKNQNTL 1028-7
51 IANKKAEADASFSTLKNQNTL 035ED-7

23/29

FIG. 21

Distancias Par de D7align.meg Clusta1W (Lenta/Precisa, Gonnat)

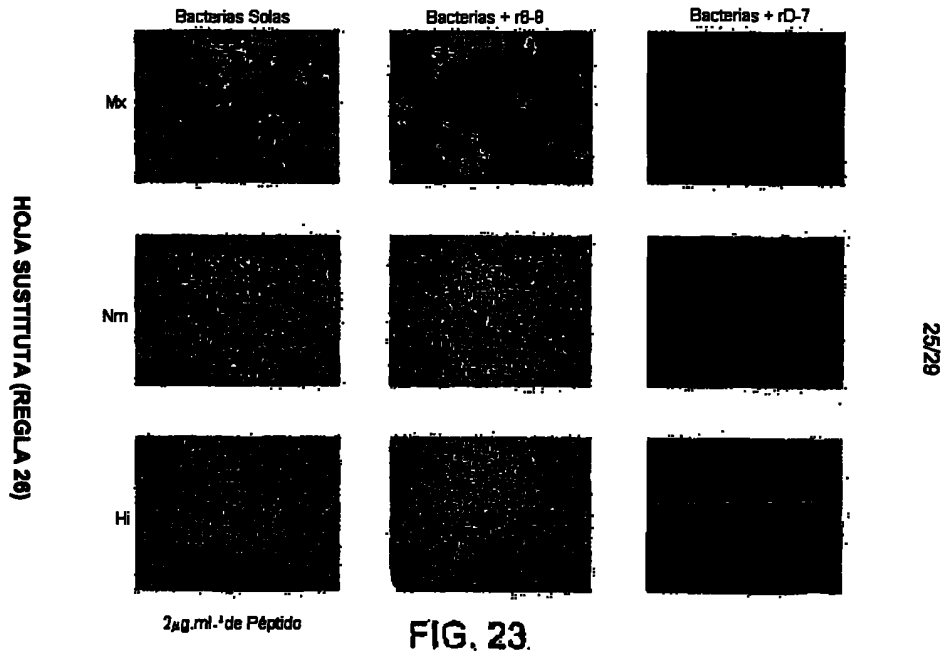
.Porcentaje de similitud en el triángulo superior
Porcentaje de Divergencia en el triángulo inferior

1)	TTA24D-7	1)	2)	3)	4)	5)	6)	7)	8)	9)	10)	1)	TTA24D-7
2)	TTA37D-7	0.0	100.0	100.0	100.0	88.9	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	2)	TTA37D-7
3)	P44D-7	0.0	0.0	100.0	100.0	90.3	100.0	100.0	100.0	87.0	83.0	3)	P44D-7
4)	O12ED-7	0.0	0.0	0.0	100.0	88.9	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	4)	O12ED-7
5)	O35ED-7	10.4	10.4	10.4	10.4	88.9	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	5)	O35ED-7
6)	Q46ED-7	0.0	0.0	0.0	0.0	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	88.9	6)	Q46ED-7
7)	MX2D-7	0.0	0.0	0.0	0.0	10.4	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	7)	MX2D-7
8)	V1171D-7	0.0	0.0	0.0	0.0	10.4	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	8)	V1171D-7
9)	MX3D-7	0.0	0.0	0.0	0.0	10.4	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	9)	MX3D-7
10)	MX4D-7	0.0	0.0	0.0	0.0	10.4	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	10)	MX4D-7

24/29

FIG. 22

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)



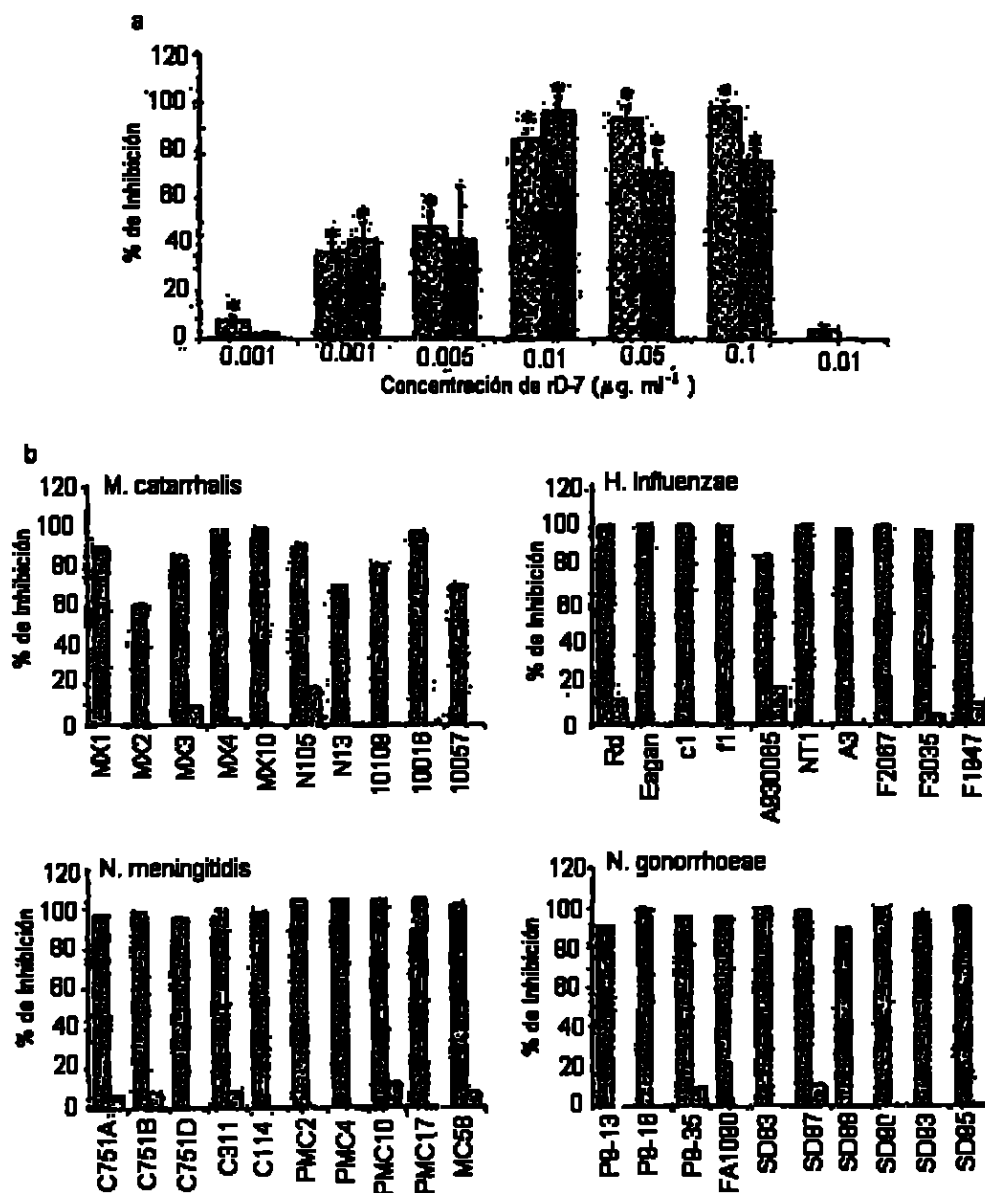


FIG. 24

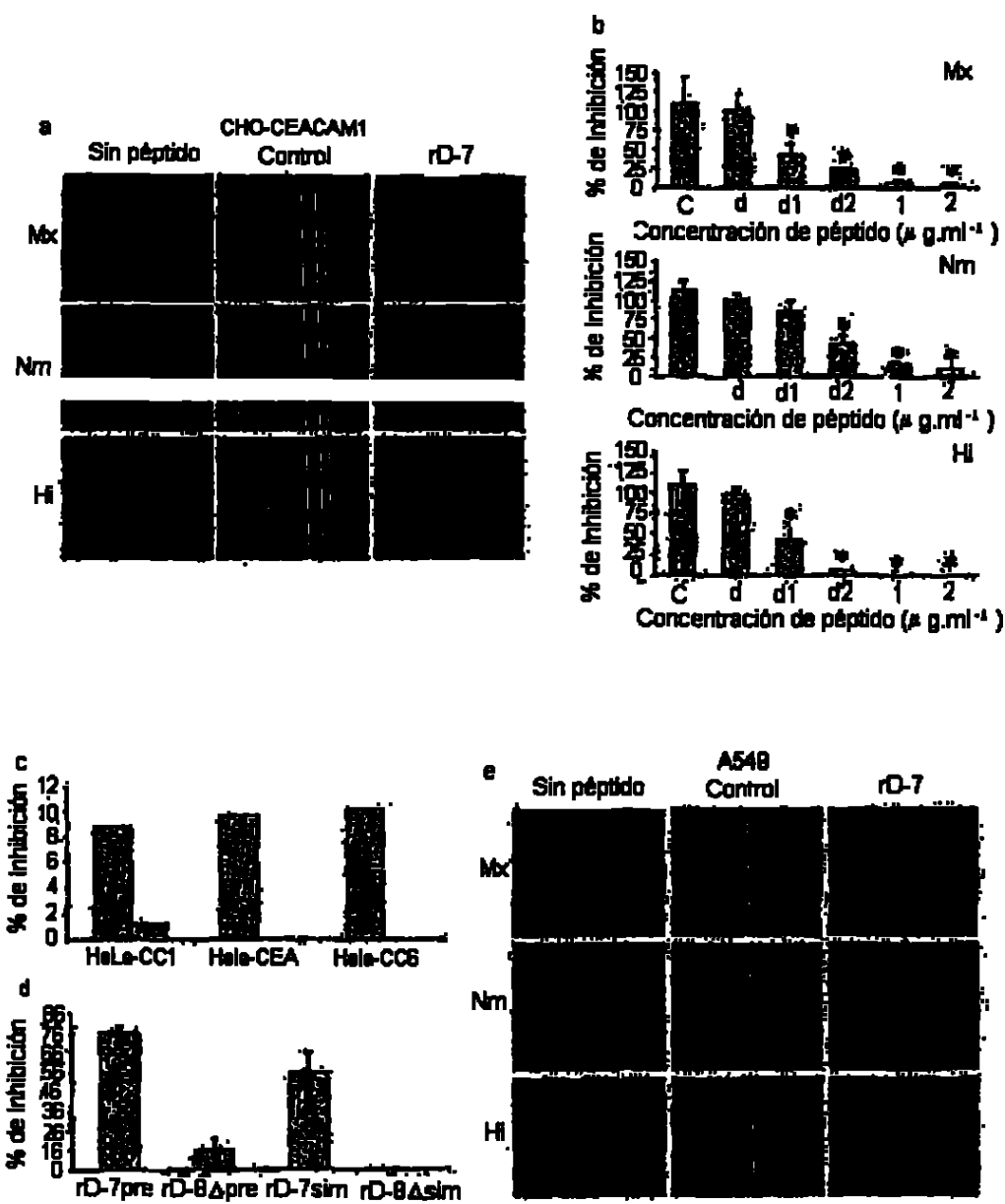


FIG. 25

28/29

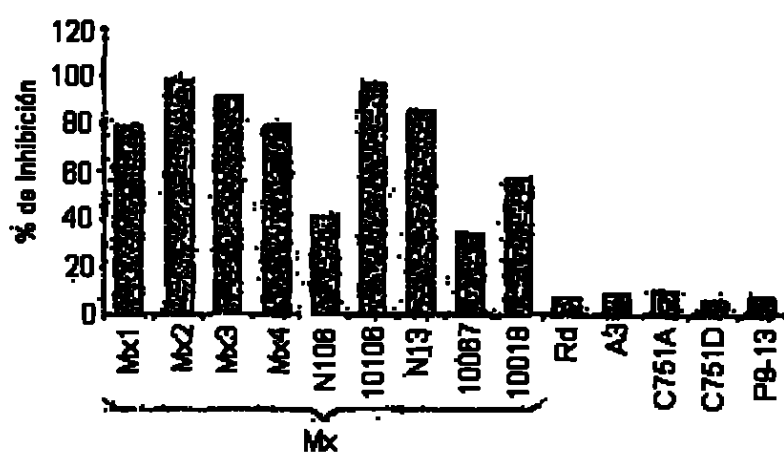


FIG. 26

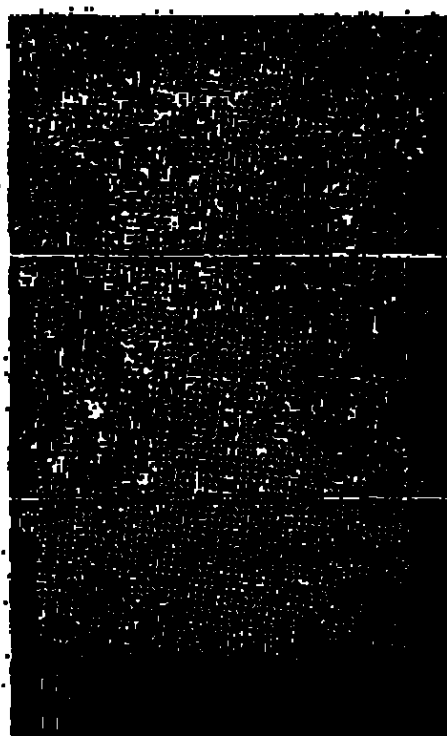


FIG. 27

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

29/29

ATCC25238	:	QHSNDTH...	20	40	+	:	30
P44 frag	:	QHSNDTH...				:	50
TTA37 frag	:	QHSNDTH...				:	50
V1171 frag	:	QHSNDTH...				:	50
O46E frag	:	QHSNDTH...				:	50
TTA24 frag	:	QHSNDTH...				:	50
O12E frag	:	QHSNDTH...				:	21
O35E frag	:	QHSNDTH...				:	21

ATCC25238	:	GRNDP...	60	80	100	:	100
P44 frag	:	GRNDP...				:	100
TTA37 frag	:	GRNDP...				:	93
V1171 frag	:	GRNDP...				:	100
O46E frag	:	GRNDP...				:	100
TTA24 frag	:	GRNDP...				:	100
O12E frag	:	GRNDP...				:	71
O35E frag	:	GRNDP...				:	71

ATCC25238	:	ASER...	120	140	:	150
P44 frag	:	ASER...			:	150
TTA37 frag	:	ASER...			:	132
V1171 frag	:	ASER...			:	150
O46E frag	:	ASER...			:	150
TTA24 frag	:	ASER...			:	150
O12E frag	:	ASER...			:	121
O35E frag	:	ASER...			:	61

ATCC25238	:	SPIT...	160	180	+	:	197
P44 frag	:	SPIT...				:	197
TTA37 frag	:	SPIT...				:	148
V1171 frag	:	SPIT...				:	197
O46E frag	:	SPIT...				:	197
TTA24 frag	:	SPIT...				:	197
O12E frag	:	SPIT...				:	168
O35E frag	:	SPIT...				:	98

FIG. 28

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION ☒ [x]

MODELO DE UTILIDAD ☐ []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒ [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒ [x] 1
- ◆ Descripción de la invención ☒ [x] 10
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒ [x] 59
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒ [x] 2

COMPLETA ☒ [x]

INCOMPLETA ☐ []

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐ []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐ []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐ []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐ []

COMPLETA ☐ []

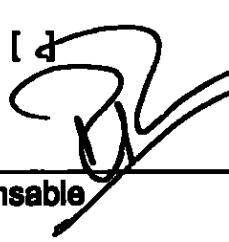
INCOMPLETA ☐ []

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐ []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐ []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐ []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐ []

COMPLETA ☒ [x]

INCOMPLETA ☐ []


Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: Info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

46

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 89

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
THE UNIVERSITY OF BRISTOL

REFERENCIA	Radicación No.	06 113634
	Solicitud internacional	PCT/GB2005/001465
	Fecha inicio fase nacional	15/11/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	2238
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

20 DIC. 2008

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

salvarado