



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 689**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01) **C07K 16/12** (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01) **A61P 31/04** (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01) **C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98931278 .0**

96 Fecha de presentación : **16.06.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **0986577**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2000**

54

Título: **Anticuerpos monoclonales y quiméricos, opsónicos y protectores, específicos para el ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas.**

30

Prioridad: **16.06.1997 US 49871 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.08.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.08.2011

73

Titular/es: **Henry M. Jackson Foundation for the
Advancement of Military Medicine
Suite 600, 1401 Rockville Pike
Rockville, Maryland 20852, US**

72

Inventor/es: **Fischer, Gerald, W.;
Schuman, Richard, F.;
Wong, Hing y
Stinson, Jeffrey, L.**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 363 689 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales y quiméricos, opsónicos y protectores, específicos para el ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas

Campo de la invención

5 Esta invención, dentro del campo de las enfermedades inmunológicas e infecciosas, se refiere a anticuerpos que son específicos para bacterias Gram positivas, en particular a ácidos lipoteicoicos expuestos sobre la superficie de las bacterias. La invención incluye anticuerpos monoclonales y quiméricos, así como sus fragmentos, regiones y derivados. Esta invención también se refiere al epítipo al cual se unen los anticuerpos de la invención así como a las secuencias, fragmentos y regiones de los epítipos. Tanto los anticuerpos como los péptidos que abarcan el
10 epítipo, y sus regiones y fragmentos, se pueden usar para la aplicación diagnóstica, profiláctica y terapéutica.

Antecedentes de la invención

El hombre ha combatido durante mucho tiempo las infecciones bacterianas, y nadie puede dudar de los enormes éxitos obtenidos. Antes del descubrimiento y del desarrollo de los antibióticos, la muerte debida a infecciones bacterianas era, con frecuencia, algo rápido e inevitable. Los procedimientos quirúrgicos y las condiciones sanitarias
15 han mejorado mucho desde los tiempos en los que las amputaciones estaban relacionadas con una tasa de mortalidad del 50 por ciento.

Sin embargo, todavía no se ha ganado la batalla. Indudablemente, una parte significativa del problema es que las bacterias son el producto de casi 3 mil millones de años de selección natural - desde que surgieron como un grupo enormemente diverso de organismos que colonizan casi todas las partes del mundo y sus habitantes. Para
20 comenzar a entender a las bacterias se requiere una clasificación, y las categorías más fundamentales para las bacterias tienen que ver con su respuesta debida a la tinción Gram, dando lugar (en su mayor parte) a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

La diferencia en la respuesta a la tinción Gram es como consecuencia de las diferencias en las paredes celulares bacterianas. Las paredes celulares de las bacterias Gram negativas están compuestas de una membrana externa
25 única con dos apilamientos de fosfolípidos-proteínas contrarios, con un fosfolípido ordinario en el apilamiento interior, pero con un lipopolisacárido muy tóxico en el apilamiento externo. Las paredes celulares de las bacterias Gram positivas parecen mucho más simples en comparación, conteniendo dos componentes principales, peptidoglicano y ácidos teicoicos más hidratos de carbono adicionales y proteínas según las especies.

De las bacterias Gram positivas, uno de los géneros más comunes es el de *Staphylococcus*. Los estafilococos colonizan comúnmente a los seres humanos y a los animales y son una causa importante de morbosidad y mortalidad humana, en particular en los pacientes hospitalizados. Los estafilococos son frecuentes en la piel y las membranas mucosas y, en consecuencia, están idealmente situados para producir tanto infecciones localizadas
30 como sistémicas.

Hay dos grupos principales de estafilococos divididos según la producción de "coagulasa", una enzima que hace que la fibrina coagule y forme un coágulo: la coagulasa negativa y la coagulasa positiva. La especie de estafilococos coagulasa positiva más patógena con frecuencia en los seres humanos es el *Staphylococcus aureus*. El *S. aureus* es el estafilococo más virulento y produce enfermedades severas y a menudo fatales tanto en huéspedes normales como en inmunodeficientes. El *Staphylococcus epidermidis* es la especie de coagulasa negativa más común.
35

En los últimos años, *S. epidermidis* se ha vuelto la causa principal de las infecciones nosocomiales en pacientes cuyos tratamientos incluyen la colocación de objetos ajenos, tales como derivaciones del fluido cerebroespinal, válvulas cardíacas, catéteres vasculares, prótesis articulares y otras implantaciones en el cuerpo. Las *S. epidermidis* y *S. aureus* son causas comunes de infecciones por heridas postquirúrgicas y *S. epidermidis* también es una causa común de la peritonitis en pacientes con diálisis peritoneal ambulatoria continua. De manera similar, los pacientes con una inmunidad dañada y los que reciben nutrición parenteral por catéteres venosos centrales tienen un riesgo alto de desarrollar sépsis por *S. epidermidis*. (C.C. Patrick, *J. Pediatr.*, **116**:497 (1990)). Se reconoce ahora que *S. epidermidis* es una causa común de la sépsis nosocomial neonatal. Las infecciones ocurren con frecuencia en niños prematuros que han recibido nutrición parenteral, que puede ser una fuente directa o indirecta de contaminación.
40

Las infecciones estafilocócicas son difíciles de tratar por una variedad de motivos. La resistencia a los antibióticos es muy común y se hace cada vez más frecuente. Véase L. Garrett, *The Coming Plague*, "The Revenge of the Germs or Just Keep Inventing New Drugs" Cap. 13, págs. 411-456, Farrar, Straus y Giroux, Nueva York, Editores (1994). En un estudio, la mayoría de los estafilococos aislados de cultivos de sangre de niños sépticos eran múltiples resistentes a los antibióticos (A. Fleer *et al.*, *Pediatr. Infect. Dis.* **2**:426 (1983)). Un estudio más reciente describe un *S. aureus* resistente a la metilicina (J. Romero-Vivas, *et al.*, *Clin. Infect. Dis.* **21**:1417-23 (1995)) y una revisión reciente señala que la aparición de la resistencia antibiótica entre aislados clínicos hace que el tratamiento sea difícil (J. Lee., *Trends in Micro.* **4** (4):162-66 (abril de 1996)). Las publicaciones recientes en los periódicos habituales también describen incidentes preocupantes respecto a la resistencia antibiótica. Véase el Washington Post "Microbe in Hospital Infections Show Resistance to Antibiotics", el 29 de mayo de 1997; el Washington Times, "Deadly bacteria outwits antibiotics", el 29 de mayo de 1997. Además, la resistencia del huésped frente a las infecciones por estafilococos no se entiende claramente. Se ha propuesto que los anticuerpos opsónicos previenen o tratan a las
55 infecciones de estafilococos. Véase, la patente de EE.UU. N^o. 5,571.511 de G.W. Fischer presentada el 5 de
60

noviembre de 1996. Los objetivos microbianos para estos anticuerpos han sido polisacáridos capsulares o proteínas superficiales. En cuanto a los polisacáridos capsulares, los estudios de inmunización de Fattom *et al.*, *J. Clin. Micro.* **30** (12):3270-3273 (1992) demostraron que la opsonización estaba relacionada con el anticuerpo anticapsular específico del tipo de *S. epidermidis*, sugiriendo que *S. epidermidis* y *S. aureus* tienen una patogénesis similar y un requerimiento opsónico como otros cocos Gram positivos encapsulados, tal como *Streptococcus pneumoniae*. Como proteínas de superficie, Timmerman, *et al.*, *J. Med. Micro.* **35**:65.71 (1991) identificó una proteína superficial de *S. epidermidis* que era opsónica para la cepa homóloga usada para la inmunización y para la producción del anticuerpo monoclonal. Aunque fueron identificados otros anticuerpos monoclonales que se unen a cepas de *S. epidermidis* no homólogas, sólo el anticuerpo monoclonal producido frente a la cepa homóloga era opsónico y la opsonización sólo aumentó frente a la cepa homóloga, pero no frente a cepas heterólogas. En consecuencia, según los estudios de Fattom *et al.*, y Timmerman *et al.*, y otros de este campo (y en contraste con nuestros propios estudios), no se esperaba que un anticuerpo que es ampliamente reactivo contra cepas múltiples de *S. epidermidis* y *S. aureus* tuviera alguna actividad opsónica frente a ambas. Esto es particularmente cierto para los anticuerpos que se unen tanto a estafilococos coagulasa positivos como coagulasa negativos.

En consecuencia, en la técnica hace falta proporcionar anticuerpos monoclonales que puedan unirse a estafilococos de ambos tipos de coagulasa y que puedan aumentar la fagocitosis y la eliminación de las bacterias y así aumentar la protección *in vivo*. También hace falta en la técnica epítomos del sitio al que pueden unirse tales anticuerpos de modo que puedan ser identificados y aislados otros anticuerpos con capacidades similares.

Hay una necesidad relacionada en la técnica de anticuerpos monoclonales de humano/ratón quiméricos humanizados u otros. En los últimos estudios publicados, los pacientes a los que se les administraron anticuerpos monoclonales anti-TNF murinos (factor de necrosis tumoral) desarrollaron respuestas de anticuerpos antimurinas frente al anticuerpo administrado (Exley A.R., *et al.*, *Lancet* **335**:1275-1277 (1990)). Este tipo de respuesta inmune al régimen de tratamiento, comúnmente denominada respuesta HAMA, disminuye la eficacia del tratamiento y puede dar hasta un tratamiento completamente ineficaz. Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales de humano/ratón humanizados o quiméricos disminuyen considerablemente la respuesta HAMA y aumentan la eficacia terapéutica. Véase LoBuglio *et al.*, *P.N.A.S.* **86**:4220-4224 (junio de 1989).

Drabik *et al.*, *Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology*, Vol **93**, (1993), pág. 109, describe un anticuerpo anti-LTA, generado contra LTA de *S. pyogenes*, cuyo anticuerpo realizó la opsonización y la eliminación de *S. pyogenes in vitro*.

Resumen de la invención

Para abordar estas necesidades en la técnica, la presente invención abarca anticuerpos opsónicos y monoclonales, protectores y quiméricos, que se unen al ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas. Los anticuerpos también se unen a bacterias enteras y aumentan la fagocitosis y la eliminación de las bacterias *in vitro* y aumentan la protección de la infección letal *in vivo*. Se ha humanizado el anticuerpo monoclonal de ratón y el anticuerpo quimérico resultante proporciona un medio previamente desconocido para diagnosticar, prevenir y/o tratar las infecciones causadas por las bacterias Gram positivas que llevan ácidos lipoteicoicos. Esta invención también abarca a un mimético peptídico del sitio de unión del epítipo del ácido lipoteicoico definido por el anticuerpo monoclonal. Este epítipo o mimético peptídico del epítipo identifica a otros anticuerpos que pueden unirse al epítipo del ácido lipoteicoico. Además, el epítipo o el mimético peptídico del epítipo proporcionan un sustrato valioso para la generación de vacunas u otras terapéuticas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 proporciona una representación esquemática del ácido lipoteicoico (ALT) en la pared de células bacterianas Gram positiva.

La figura 2 representa regiones de anticuerpo, tales como la región constante de la cadena pesada (CH), la región variable de la cadena pesada (VH), la región constante de la cadena ligera (CL) y la región de variable de la cadena ligera (VL).

La figura 3 muestra el aumento de la supervivencia después de la administración de MAB 96-110 en un modelo neonatal letal de sépsis por estafilococo coagulasa positivo.

La figura 4 muestra el aumento de la supervivencia en ratones adultos infectados por estafilococos coagulasa negativos después de la administración de MAB 96-110. Aproximadamente 23 horas después de la infección, el 70 % de los animales tratados con MAB 96-110 estaban vivos comparado con el 20 % de animales a los que no se les dio el anticuerpo.

La figura 5 (SEQ ID NOS 4 y 5, y 6 y 7, respectivamente) proporciona una lista de 18 secuencias resultantes para el enriquecimiento de la biblioteca de 6mero.

La figura 6 (SEQ ID NOS 8-43, respectivamente) proporciona una lista de las 18 secuencias resultantes para el segundo experimento del enriquecimiento de la biblioteca de 15mero.

La figura 7 (SEQ ID NOS 44 & 45, y 46 & 47, y 48 & 49, respectivamente) proporciona una lista de las 17 secuencias resultantes para el primer experimento del enriquecimiento de la biblioteca de 15mero.

La figura 8 (SEQ ID NOS 50-67, respectivamente) proporciona una lista maestra compilada de las secuencias peptídicas comunes resultantes de todos los enriquecimientos.

La figura 9 muestra una comparación de las señales de densidad óptica de cada fago aislado a $6,25 \times 10^{11}$ vir/ml.

La figura 10 muestra la estrategia para clonar los fragmentos de genes de la región variable.

5 La figura 11 (SEQ ID NOS. 68-85, respectivamente) enumera los cebadores de los oligonucleótidos usados.

La figura 12 (SEQ ID NOS. 86-105, respectivamente) proporciona la secuencia de ADN consenso final de las regiones variables de la cadena pesada y ligera.

La figura 13 muestra la re-amplificación de los fragmentos de genes de la región variable.

La figura 14 muestra el mapa del plásmido para pJRS334.

10 La figura 15 proporciona los resultados del ensayo de producción de anticuerpos, mostrando que la transfección de células con el constructo plasmídico causa la producción de una molécula que contiene tanto a IgG humanas como dominios kappa.

La figura 16 proporciona los resultados del ensayo de actividad, demostrando que la transfección de células con el constructo plasmídico causa la producción de una molécula que se une al antígeno de Hay.

15 La figura 17 representa la actividad opsonica del anticuerpo monoclonal quimérico 96-110 para *S. epidermidis* en el ensayo bactericida opsonofagocítico mediado por neutrófilos.

La figura 18 muestra el aumento de la supervivencia después de la administración de MAB 96-110 en un modelo letal de sépsis por *S. epidermidis*.

20 La figura 19 representa el efecto del anticuerpo monoclonal quimérico 96-110 en la supervivencia de ratones adultos después de una exposición intraperitoneal con *S. epidermidis*.

La figura 20 muestra el efecto del anticuerpo monoclonal quimérico 96-110 en bacteremias en un modelo de *S. epidermidis* letal.

La figura 21 representa niveles de bacteremia cuatro horas después de la infección con *S. epidermidis* con dosis diferentes del anticuerpo monoclonal quimérico 96-110.

25 La figura 22 muestra el efecto del anticuerpo monoclonal quimérico 96-110 en la supervivencia en un modelo de sépsis de *S. epidermidis* neonatal letal.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal, o su fragmento de unión al antígeno, obtenible por la inmunización con la cepa Hay de *S. epidermidis* (Nº. de depósito ATCC 55133), que se une específicamente al ácido lipoteicoico (ALT) de bacterias Gram positivas y es de un isotipo de IgG, en donde el anticuerpo se une y aumenta la opsonización de serotipos múltiples de *Staphylococcus epidermidis*, estafilococos coagulasa negativos, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* por células fagocíticas con o sin el complemento comparado con un control apropiado en un ensayo de opsonización *in vitro*, y en donde el anticuerpo es capaz de prevenir la infección estafilocócica en neonatos.

35 En una realización, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de la invención que es un anticuerpo humanizado o su fragmento de unión al antígeno, que comprende una cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la secuencia 96-110 de la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina expuesta en las SEQ ID NOs 98, 100 y 104 y una cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la secuencia 96-110 de
40 inmunoglobulina de la región variable de la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO 88, 90 y 94.

En otra realización la invención proporciona un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de la invención que comprende la región variable de la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO de 86 a 95 y la región variable de la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO de 96 a 105.

45 En una realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de la invención que comprende una región variable de la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO de 96 a 105, a condición de que el aminoácido 1 de la cadena ligera sea el ácido aspártico y el aminoácido 106 de la cadena ligera sea la lisina.

50 En todavía una realización más, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de la invención, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico que comprende las secuencias de inmunoglobulina 96-110 de la región variable de las cadenas pesada y ligera expuestas en SEQ ID NO de 86 a 105 y una región constante humana.

En una realización preferida la invención proporciona un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de la invención, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo anti-ALT, comprendiendo la cadena ligera:

(i) las regiones determinantes de complementariedad de la región variable (CDR) de la secuencia 96-110 de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina expuesta en SEQ ID NO 98, 100 y 104

(ii) las regiones determinantes de complementariedad de la región variable (CDR) de la secuencia de inmunoglobulina 96-110 de la región variable de la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO 88, 90 y 94; e

5 (iii) una región marco variable de una cadena pesada aceptadora humana de inmunoglobulina.

Los anticuerpos, los fragmentos, las regiones y sus derivados de la invención preferiblemente reconocen y se unen a un epítipo de ALT que puede bloquear la unión de bacterias Gram positivas a células epiteliales, tales como células epiteliales humanas. En consecuencia, la invención proporciona anticuerpos ampliamente reactivos y opsónicos para el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento o infecciones bacterianas causadas por bacterias Gram

10 positivas.

Los anticuerpos de la invención son ampliamente reactivos con bacterias Gram positivas, lo que significa que reconocen y se unen selectivamente a bacterias Gram positivas y no reconocen o se unen a bacterias Gram negativas. Se puede usar cualquier ensayo de unión convencional para evaluar esta unión, incluyendo, por ejemplo, ensayo de unión inmunoabsorbente unido a enzima descrito más abajo. La base de la unión es la presencia del ALT

15 expuesto en la superficie de la pared de la célula de bacterias Gram positivas.

Como se dice más arriba, las paredes de las células de bacterias Gram positivas contienen característicamente peptidoglicanos, tales como mureina así como ácidos teicoicos. Los ácidos teicoicos son polímeros de fosfato de glicerol o de fosfato de ribitol con varios azúcares, amino azúcares, y aminoácidos como sustituyentes. Aunque las

20 longitudes de las cadenas y la naturaleza y la posición del sustituyentes varíen de especie a especie y a veces entre especies, en los ácidos teicoicos generales constituyen una parte principal de la pared celular. Los ácidos teicoicos relacionados con esta invención son ácidos lipoteicoicos que son ácidos teicoicos compuestos de fosfato de glicerol que está unido principalmente a un glicolípido en la membrana celular subyacente. Aunque no sea conocida la estructura precisa del ALT en la pared celular bacteriana Gram positiva, se expone en la figura 1 una representación esquemática estándar comúnmente aceptada en la técnica. En consecuencia, los anticuerpos de la invención

25 reivindicada son muy reactivos porque reconocen y se unen a los ácidos lipoteicoicos que están característicamente superficialmente expuestos en las bacterias Gram positivas.

Los anticuerpos de la invención también son opsónicos, o muestran cierta actividad opsónica, para las bacterias Gram positivas. Como se reconoce en la técnica, la "actividad opsónica" se refiere a la capacidad de una opsonina (generalmente, un anticuerpo o el factor de suero C3b) de unirse a un antígeno para promover la unión del antígeno

30 al fagocito y así aumentar la fagocitosis. Ciertas bacterias, sobre todo las bacterias encapsuladas que resisten la fagocitosis debido a la presencia de la cápsula, se vuelven muy atractivas para los fagocitos, tales como neutrófilos y macrófagos cuando se recubren de un anticuerpo opsónico y su tasa de aclaración de la corriente sanguínea aumenta sorprendentemente. Puede medirse la actividad opsónica de cualquier manera convencional como se describe más abajo.

La capacidad de los anticuerpos anti-ALT de la invención para unirse y opsonizar bacterias Gram positivas y así

35 aumentar la fagocitosis y la eliminación de la célula *in vitro* y aumentar la protección *in vivo* son completamente inesperadas porque se ha descrito que los anticuerpos anti-ALT carecen de actividad opsónica. En efecto, los anticuerpos anti-ALT a menudo se han usados como controles.

Por ejemplo, Fattom *et al.*, *J. Clin. Micro.* **30** (12):3270-3273 (1992) examinó la actividad opsónica de anticuerpos inducidos contra el polisacárido capsular específico del tipo de *S. epidermidis*, usando como controles anticuerpos

40 inducidos contra ácidos teicoicos y contra *S. hominus*. Aunque los anticuerpos específicos para el tipo eran muy opsónicos, los anticuerpos anti-ácidos teicoicos no eran diferentes de los anticuerpos anti-*S. hominus*.

Del mismo modo, en Kojima *et al.*, *J. Infect. Dis.* **162**:435-441 (1990), los autores evaluaron los efectos protectores del anticuerpo frente al polisacárido capsular/adherencia contra bacteremias relacionadas con catéteres debido a

45 estafilococos coagulasa negativo y se usó específicamente una cepa de *S. epidermidis* que expresaba el ácido teicoico como control. Véase la página 436, Materiales y Métodos, columna izquierda, primer ¶; columna derecha, tercer ¶. En un estudio posterior, los autores alcanzaron una conclusión más explícita contra la utilidad de anticuerpos anti-teicoicos: los protocolos de inmunización diseñados para deducir el anticuerpo frente al ácido teicoico pero no a PS/A no produjeron ninguna protección contra bacteremias o endocarditis.

50 Takeda, *et al.*, *Blood* **86** (6):2539-2546 (1991).

Al contrario de la opinión predominante en el campo, los anticuerpos opsónicos muy reactivos contra el ALT de bacterias Gram positivas, incluyendo *S. aureus* y *S. epidermidis*, de la invención satisfacen una necesidad clara en la técnica. Como se describe en la sección de los antecedentes, tanto *S. aureus* como *S. epidermidis* son causas

55 comunes de infecciones de daños quirúrgicos; *S. epidermidis* se ha vuelto una causa principal de las infecciones nosocomiales en pacientes cuyos tratamientos incluyen la colocación de objetos ajenos: *S. epidermidis* se ha vuelto una causa común de peritonitis en pacientes con diálisis peritoneal ambulatoria continua; y ahora se reconoce que la *S. epidermidis* es una causa común de la sepsis neonatal.

En efecto, el laboratorio de los inventores se ha ocupado recientemente con enormes esfuerzos en encontrar anticuerpos muy opsónicos como se detalla en una patente publicada, específicamente:

La patente de EE.UU. Nº. 5 571 511, publicada el 5 de noviembre de 1996 por Gerald W. Fischer, titulada "Broadly Reactive Opsonic Antibodies that React with Common Staphylococcal Antigens".

La patente publicada describe la búsqueda de anticuerpos opsónicos muy reactivos en particular contra estafilococos. En un amplio orden cronológico, las aplicaciones de "Globulina inmune humana dirigida" describen la selección y el uso de una Globulina inmune humana dirigida para prevenir o tratar las infecciones causadas por *S. epidermidis* que contiene anticuerpos con capacidad de unirse a antígenos de superficie de *S. epidermidis* en un ELISA y la exposición de más del 80 % de actividad bactericida opsonofagocítica contra *S. epidermidis* en un ensayo *in vitro* particularmente descrito. Las reivindicaciones de la patente publicada describen por primera vez una cepa particular de *S. epidermidis* que identifica a anticuerpos opsónicos muy reactivos tanto contra estafilococos coagulasa negativos como contra coagulasa positivos y específicamente reivindica una preparación de antígeno aislada de una cepa de *S. epidermidis* Hay ATCC 55133, depositada el 19 de diciembre de 1990, que genera el anticuerpo opsónico muy reactivo que específicamente reacciona en un ensayo con serotipos I, II e III de *S. epidermidis*, y que muestra una actividad opsónica mayor que el 70 %. La aplicación de los "Métodos *in vitro*" describe el uso de *S. epidermidis* Serotipo II, como la cepa Hay, que identifica infecciones de estafilococo patógenas. La cuarta aplicación en la cadena describe una proteína superficial identificada en la cepa Hay que puede inducir anticuerpos opsónicos muy reactivos.

Sin embargo, la búsqueda de los anticuerpos continuó, tanto para los policlonales como los monoclonales, que son muy reactivos y opsónicos contra todas las bacterias Gram positivo y ha culminado en la presente invención. Habiendo descubierto la cepa Hay y determinado su capacidad única de generar anticuerpos muy opsónicos contra estafilococos, se usó como base para esta búsqueda.

Como se muestra en el Ejemplo 1, fueron inmunizados ratones con la cepa Hay entera de *S. epidermidis* a partir de cuyos hibridomas fueron producidos. En la selección de hibridomas para anticuerpos, los anticuerpos de un clon (primero denominado IF6 96-105CE11 y más tarde denominado 96-110 MAB) mostraron una reacción IgG fuerte (Tablas 1 y 2) y, en pruebas adicionales, fueron encontrados que se unían muy fuertemente a bacterias Gram positivas, por ejemplo, la cepa Hay, a tres serotipos de *S. epidermidis*, *S. hemolyticus*, *S. hominus*, y dos serotipos de *S. aureus* (Tablas 3-6), pero no al control Gram negativo, *Haemophilus influenza*.

Similar a los anticuerpos descritos en las aplicaciones de Fischer y la patente expuesta más arriba, el anticuerpo de la presente invención muestra una unión muy fuerte, es decir, O.D.s de aproximadamente dos veces la línea de fondo en un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (descrito más abajo), contra la cepa Hay. En una realización preferida, el alto nivel de unión es igual o mayor que cinco veces la línea de fondo. En otras realizaciones, el alto nivel de unión es igual o mayor que 10 veces la línea de fondo. Por supuesto, cualquier aumento significativo respecto a la línea de fondo (el nivel observado con todos los reactivos además del anticuerpo probado) será reconocido por las personas expertas en la técnica como una unión alta y por lo tanto está dentro del ámbito de la invención.

También, como se describe en las aplicaciones de Fischer y en la patente, se ha encontrado que la alta unión guarda correlación con la actividad opsónica. Como se muestra en el Ejemplo 2, en un ensayo bactericida mediado con neutrófilos (descrito más abajo), el MAB de 96-110 mostró una mayor opsonización contra las bacterias coagulasa negativas arquetípicas, *S. epidermidis*, y contra las bacterias coagulasa positivas arquetípicas, *S. aureus*. Con este nivel de actividad opsónica, un anticuerpo debería aumentar la fagocitosis y la eliminación de células tanto de bacterias coagulasa positivas como coagulasa negativas.

El término "mayor" se refiere a la actividad que supera mensurablemente la línea de fondo en un nivel alto. El nivel estimado en alto puede variar según las circunstancias específicas de la infección, incluyendo el tipo de bacterias y la severidad de la infección. Por ejemplo, para una mayor actividad opsónica o fagocítica, en una realización preferida, una respuesta mayor es igual o mayor que el 75 % respecto a la línea de fondo. En otra realización preferida, la respuesta mayor es igual o mayor que el 80 % respecto a la línea de fondo. En otra realización más, la respuesta mayor es igual o mayor que el 90 % respecto a la línea de fondo.

Para confirmar que el anticuerpo, que previamente mostró que era muy reactivo, así como opsónico, es protector *in vivo*, fue evaluado MAB 96-110 en un modelo de infección letal tanto en ratas neonatales como en ratones adultos. Como se muestra en el Ejemplo 3, la supervivencia en los animales control que no se les administró ninguna terapia, solución salina, o MAB control, estaba en el intervalo de 0 a menos del 10 %. Sin embargo, el MAB 96-110 aumentó la supervivencia al 50 % o mayor.

Cuando, como ocurre en esta invención, el aumento medido es de la supervivencia, el aumento preferido respecto a la línea de fondo puede ser más modesto que lo anterior. Así, un aumento de la supervivencia del 25 % puede ser una respuesta mayor. En otras realizaciones, la supervivencia mayor puede ser mayor que el 50 %. De nuevo, la persona experta en la técnica reconocería dentro de la invención otros aumentos significativos de la supervivencia.

En vista de la impresionante actividad opsónica *in vitro* así como de la actividad protectora *in vivo* de MAB 96-110, los inventores buscaron la identidad del epítipo del antígeno al cual se unía. Un "antígeno" es una molécula o una parte de una molécula capaz de unirse a un anticuerpo y que también es capaz de inducir a un animal a producir el anticuerpo capaz de la unión a un epítipo de aquel antígeno. Un antígeno puede tener uno o varios epítipos. Un "epítipo" significa análogamente aquella parte de la molécula que es capaz de ser reconocida y unida por un anticuerpo. En general, los epítipos consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas,

tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar que tienen características específicas estructurales tridimensionales y de carga específicas.

En una serie de experimentos de enriquecimiento expuesta en los Ejemplos 4-6, los inventores identificaron secuencias peptídicas a las cuales se unió fuertemente MAB 96-110. Estas secuencias proporcionan al menos los miméticos peptídicos del epítipo al cual se unió MAB 96-110. Así, dicho péptido tiene la secuencia

W R M Y F S H R H A H L R S P (SEQ ID NO 1)

y el otro péptido tiene la secuencia

W H W R H R I P L Q L A G R (SEQ ID NO 2).

Por supuesto, el epítipo puede ser idéntico a una de estas secuencias o puede ser sustancialmente homólogo a estas secuencias tal que los anticuerpos anti-ALT de la invención se unan a ellos. O bien, las secuencias sustancialmente homólogas de la descripción son aquellas que son capaces de inducir los anticuerpos anti-ALT de la invención. Otros miméticos peptídicos de epítipo pueden variar en la longitud y secuencia de estos dos péptidos.

La presente descripción también abarca a epítopos recombinantes, miméticos de epítipo y antígenos. La secuencia de ADN del gen que codifica para el antígeno aislado puede ser identificada, aislada, clonada y transferida a una célula procariótica o eucariótica para su expresión por procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los procedimientos son los generalmente descritos en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2ª Ed., Cold Springs Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989).

Para confirmar la especificidad de los péptidos para el anticuerpo monoclonal, fue probado en un ensayo de inhibición competitivo y se encontró que inhibía la unión de MAB 96-110 para la cepa Hay. Véase el Ejemplo 6.

Para determinar la proteína de la cual tales secuencias son una parte, los inventores compararon las secuencias peptídicas con las secuencias proteicas, pero, como se muestra en el Ejemplo 7, no se pudo identificar cualquier proteína conocida. En consecuencia, los inventores ampliaron la búsqueda de otros candidatos de antígeno. Como la secuencia del péptido era pequeña y había inhibido con éxito la unión de MAB 96-110 para la cepa Hay y como MAB 96-110 se unía y opsonizaba tres serotipos de *S. epidermidis* así como tanto a bacterias coagulasa positivas como coagulasa negativas, los inventores evaluaron la posibilidad de que el péptido fuera parte del ácido lipoteicoico expuesto en la superficie. Para sorpresa de los inventores, como se muestra en el Ejemplo 7, estos encontraron que MAB 96-110 unido a los ALT de varias bacterias Gram positivas, tales como *S. mutans*, *S. aureus*, *S. faecalis* y *S. pyogenes* (grupo A Streptococcus).

Por tanto, la presente invención incluye anticuerpos que son capaces de unirse al ALT de bacterias Gram positivas, incluyendo tanto bacterias coagulasa positivas como coagulasa negativas, y de aumentar la opsonización de tales bacterias. Estos anticuerpos anti-ALT incluyen anticuerpos policlónicos así como anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas de la invención, tal como MAB 96-110 así como otros anticuerpos monoclonales, sus fragmentos y regiones, así como sus derivados. Como se muestra antes, la fuerza de la unión puede estar en el intervalo de dos veces por encima de la línea de fondo, a cinco y diez veces por encima de la línea de fondo. Además, los anticuerpos, los fragmentos, las regiones y los derivados de la presente invención son capaces de aumentar la opsonización de tales bacterias, a tasas en los límites del 75 % y superior.

Los "fragmentos" de los anticuerpos de la invención incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂ y SFv. Estos fragmentos son producidos utilizando anticuerpos intactos por métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, división proteolítica con enzimas, tal como la papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir F(ab')₂). Las "regiones" de los anticuerpos de la presente invención incluyen una región constante de la cadena pesada (H_c o CH), una región variable de la cadena pesada (H_v o VH), región constante de la cadena ligera (L_c o CL), y una región variable de la cadena ligera (L_v o VL) (figura 2). Las cadenas ligeras pueden ser una cadena una lambda o kappa.

En un aspecto preferido de la invención, las regiones incluyen al menos una región variable de la cadena pesada o una región variable de la cadena ligera que se une a una parte de ALT, incluyendo, por ejemplo, los sitios de unión específicos de antígeno (los que se unen al epítipo) de las dos regiones. En otra realización, estas dos regiones variables pueden unirse como un anticuerpo de cadena sencilla. Aunque una cadena pesada de longitud completa puede ser crítica para la actividad opsónica y para aumentar la actividad de anti-citoquina (anti-inflamatoria), los fragmentos de anticuerpo que abarcan las regiones variables pueden ser adecuados para la inhibición de la unión bacteriana a células epiteliales y también pueden ser anti-inflamatorios.

En un aspecto particularmente preferido de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo de ratón/humano quimérico compuesto de regiones de anticuerpos anti-ALT de la invención junto con regiones de anticuerpos humanos. Por ejemplo, una cadena H quimérica puede comprender la región de unión del antígeno de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-ALT de la invención unida a al menos una parte de una región constante de la cadena pesada humana. Esta cadena pesada humanizada o quimérica puede ser combinada con una cadena L quimérica que comprende la región de unión del antígeno de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-ALT unida a al menos una parte de la región constante de la cadena ligera humana.

Los anticuerpos quiméricos de la invención pueden ser inmunoglobulinas monovalentes, divalentes o polivalentes. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico monovalente es un dímero (HL) formado por una cadena H quimérica asociada por puentes disulfuro con una cadena L quimérica, como se dice anteriormente. Un anticuerpo quimérico

divalente es un tetrámero (H₂L₂) formado por dos dímeros HL asociados por al menos un puente disulfuro. Un anticuerpo quimérico polivalente está basado en una agregación de cadenas.

Un anticuerpo quimérico particularmente preferido de la invención es descrito en los Ejemplos 8-10 que muestran detalladamente la preparación de un anticuerpo IgG quimérico preferido (y en los Ejemplos 11-13 que describen la actividad funcional de este anticuerpo quimérico preferido). Por supuesto, están dentro de la invención otros anticuerpos quiméricos formados de secciones diferentes de los anticuerpos anti-ALT de la invención. Particularmente, la región constante de la cadena pesada puede ser una IgM o un anticuerpo de IgA.

Además de los fragmentos proteicos y las regiones de los anticuerpos, la presente invención también abarca la secuencia de ADN del gen que codifica para los anticuerpos así como los péptidos codificados por el ADN. El ADN particularmente preferido y las secuencias peptídicas se muestran en la figura 12. Dicha figura proporciona las regiones variables de ambas cadenas pesadas y ligeras de MAB 96-110, incluyendo las Regiones Determinantes de Complementariedad ("CDR"), las secuencias de aminoácidos hipervariables dentro de las regiones variables del anticuerpo que interaccionan con los aminoácidos en el antígeno complementario. La invención incluye a éstos ADN y las secuencias peptídicas así como el ADN y las secuencias peptídicas que son homólogas a estas secuencias. En una realización preferida, estas secuencias son un 70 % homólogas aunque otras realizaciones preferidas incluyan secuencias que son un 75 %, 80 %, 85 %, 90 % y 95 % homólogas. La determinación de estos niveles de homología tanto para el ADN como para la secuencia peptídica es conocida dentro de pericia rutinaria de los expertos en la técnica.

Las secuencias de ADN de la invención pueden ser identificadas, aisladas, clonadas y transferidas a una célula procariótica o eucariótica para su expresión por procedimientos conocidos en la técnica. Tales procedimientos son descritos generalmente en Sambrook *et al.*, *supra*, así como en *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, editores, John Wiley & Sons, 1989). En una realización preferida, la CDR puede ser representada gráficamente en cualquier marco de anticuerpo humano usando las técnicas estándares en la técnica, de tal manera que la CDR mantenga la misma especificidad de unión que en el anticuerpo intacto.

Además, el ADN y las secuencias peptídicas de los anticuerpos de la invención, incluyendo tanto a anticuerpos monoclonales como incluyendo a quiméricos, pueden formar la base de "derivados" de anticuerpos, que incluyen, por ejemplo, las proteínas o péptidos codificados por genes truncados o modificados. Dichas proteínas o péptidos pueden funcionar de manera similar a los anticuerpos de la invención. También están dentro de la presente invención otras modificaciones, tales como la adición de otras secuencias que pueden aumentar la función efectora, que incluyen la fagocitosis y/o la eliminación de las bacterias.

La presente invención también describe una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos anti-ALT de la invención, así como sus fragmentos de unión del antígeno de junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como agua, aceites, incluyendo aceite de petróleo, aceite animal, aceite vegetal, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de ajonjolí y otros similares. Con la administración intravenosa, el agua es el vehículo preferido. También pueden ser empleadas como vehículos líquidos las soluciones salinas, la dextrosa acuosa y las soluciones de glicerol, particularmente para las soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados son descritos en el *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18^a Edición (A. Gennaro. Ed., Mack Pub., Easton, Pa, 1990).

Finalmente, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal de la invención para su uso en la prevención de infecciones estafilocócicas en neonatos y el uso de una dosis eficaz de un anticuerpo monoclonal de la invención en la fabricación de un medicamento para la prevención de una infección estafilocócica en neonatos. Los medicamentos son administrados a pacientes en cantidades terapéuticamente eficaces. Un paciente puede ser un ser humano u otro mamífero, tal como un perro, un gato, una vaca, ovejas, un cerdo o una cabra. El paciente es preferiblemente un ser humano.

Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que se piensa razonablemente que proporciona alguna medida de alivio o ayuda en el tratamiento de la infección. Tal terapia como se describe antes o más abajo puede ser primaria o suplementaria con el tratamiento adicional, como una terapia antibiótica, para una infección estafilocócica, una infección causada por un agente diferente, o una enfermedad sin relación. En efecto, la terapia de combinación con otros anticuerpos está específicamente contemplada dentro de la invención.

Los medicamentos se pueden usar en un método para prevenir tales infecciones, que comprende la administración de una cantidad profilácticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-ALT (o policlónico o monoclonal o quimérico, incluyendo sus fragmentos, regiones y derivados) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una cantidad profilácticamente eficaz es una cantidad que se piensa razonablemente que proporciona alguna medida en la prevención de la infección por bacterias Gram positivas. Dicha terapia como se describe antes o más abajo puede ser primaria o suplementaria al tratamiento adicional, como una terapia antibiótica, para una infección estafilocócica, una infección causada por un agente diferente, o una enfermedad sin relación. En efecto, la terapia de combinación con otros anticuerpos es contemplada específicamente dentro de la invención.

Los anticuerpos de la invención o sus fragmentos de unión por el antígeno se pueden usar como una vacuna junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Bajo la introducción en un huésped, la vacuna genera un anticuerpo

ampliamente protector y opsónico contra la infección por bacterias Gram positivas - la vacuna puede incluir el epítopo, un epítopo mimético, cualquier mezcla de epítopos y miméticos de epítopo, el antígeno, antígenos diferentes, o cualquier combinación de epítopos, miméticos de epítopo y antígenos.

5 Las vacunaciones son particularmente beneficiosas para aquellos individuos que se sabe o se sospecha que están en peligro de una infección por bacterias Gram positivas. Esto incluye a pacientes que reciben implantaciones corporales, tales como válvulas, pacientes con catéteres permanentes, pacientes que se disponen a someterse a la cirugía que implica una rotura o un daño en la piel o el tejido mucoso, ciertos trabajadores de asistencia médica, y los pacientes que se espera que desarrollen sistemas inmunológicos perjudicados de alguna forma por la terapia, tal como por terapia de radiación o quimioterapia.

10 El tratamiento comprende la administración de la composición farmacéutica (incluyendo anticuerpos y vacunas) por inyección intravenosa, intraperitoneal, intracorpórea, intraarticular, intraventricular, intratecal, intramuscular, subcutánea, intranasalmente, intravaginalmente, oralmente, o por cualquier otro método eficaz de la administración. La composición también puede darse localmente, tal como por inyección en el área particular infectada, intramuscularmente o subcutáneamente. La administración puede comprender la administración de la composición farmacéutica limpiando, sumergiendo, empapando o limpiando directamente al paciente. El tratamiento también puede ser aplicado a objetos que se colocan dentro de un paciente, tales como catéteres permanentes, válvulas cardíacas, válvulas del fluido cerebroespinal, prótesis articular, otras implantaciones en el cuerpo, o cualquier otro objeto, instrumentos o aplicaciones en peligro de volverse infectados por bacterias Gram positivas, o en peligro de introducir tal infección en un paciente.

20 Como un corolario particularmente valioso del tratamiento con las composiciones de la invención (incluyendo los anticuerpos de la invención o sus fragmentos de unión del antígeno), todas las composiciones farmacéuticas basadas en tales anticuerpos, así como en el epítopo, miméticos de epítopo u otra parte del ALT, antígeno y vacunas basadas en tal epítopo o antígenos) es la reducción de la liberación de citoquina que resulta de la introducción del ALT de bacterias Gram positivas. Como es reconocido ahora en la técnica, el ALT induce citoquinas, incluyendo por ejemplo el factor de necrosis tumoral alfa, Interleuquina 6 e interferón gamma. Véase Takada *et al.*, *Infection and Immunity*, **63** (1):57-65 (enero de 1995). En consecuencia, las composiciones de la invención pueden aumentar la protección a tres niveles: (1) uniendo el ALT en las bacterias y bloqueando así la unión inicial a células epiteliales y la prevención de la invasión subsecuente de las bacterias; (2) aumentando la opsonización de las bacterias y aumentando así la aclaración de las bacterias de tejidos y sangre; y/o (3) uniendo el ALT y parcialmente o totalmente bloqueando la liberación de citoquina y modulando las respuestas inflamatorias para prevenir el choque y la destrucción de tejidos.

35 Habiendo descrito de forma general la invención, está claro que la invención supera algunos problemas potencialmente serios descritos en los antecedentes en cuanto al desarrollo de antibióticos resistentes a bacterias Gram positivas. Como se describe antes, los estafilococos y los estreptococos (tales como el *S. faecalis*) se han vuelto cada vez más resistentes y, con la reciente extensión de cepas resistentes a vancomicina, la terapia antibiótica puede volverse totalmente ineficaz.

Los aspectos particulares de la invención son presentados ahora en la forma de los siguientes "Materiales y Métodos" así como los Ejemplos específicos.

40 **Materiales y métodos**

Bacterias

La *S. epidermidis*, cepa Hay, fue depositada en el ATCC el 19 de diciembre de 1990 con el número de entrada 55133.

Hibridoma

45 El hibridoma 96-110 fue depositado en el ATCC el 13 de junio de 1997 con el número de entrada HB-12368.

Ensayo de determinación del isotipo

El isotipo fue determinado usando un kit de isotipo obtenido de los Laboratorios Zymed. El kit puede ser pedido con el número 90-6550.

Ensayos de unión

50 En el ensayo de unión de la invención, la inmunoglobulina se hace reaccionar con una preparación de un organismo estafilocócico. El ensayo de unión es preferiblemente un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA), pero también puede ser un ensayo de aglutinación, un ensayo de coagulación, un ensayo colorimétrico, un ensayo de unión fluorescente o cualquier otro ensayo de unión adecuado que es conocido en la técnica. El ensayo puede ser realizado por procedimientos competitivos o no competitivos con resultados determinados directamente o indirectamente.

55 La preparación de los estafilococos puede ser fijada a un soporte sólido adecuado, tal como una placa de vidrio o de plástico, pocillo, cuenta, microcuenta, pala, hélice o varilla. El soporte sólido es preferiblemente una placa de titulación. La preparación fijada es incubada con inmunoglobulina, que se aísla o en un fluido biológico, tal como

fluido ascítico, y se determina la cantidad de unión. Una reacción positiva ocurre cuando la cantidad de unión observada para la muestra de ensayo es mayor que la cantidad de unión para un control negativo. Un control negativo es cualquier muestra conocida que no contiene la inmunoglobulina específica para el antígeno. La unión positiva puede ser determinada a partir de una reacción positiva/negativa simple o a partir del cálculo de una serie de reacciones. Esta serie puede incluir muestras que contienen cantidades medidas de la inmunoglobulina que se une específicamente al antígeno fijo, creando una curva estándar de la cual puede ser determinada la cantidad de la inmunoglobulina específica para el antígeno en una muestra desconocida. O bien, el anticuerpo puede ser fijado a un soporte sólido y la inmunoglobulina puede ser identificada por su capacidad de unir una preparación bacteriana unida a los anticuerpos fijados.

Los datos específicos de los ensayos usados en los Ejemplos se muestran más abajo:

Inmunoensayo en caldo bacteriano fijado en metanol: fueron suspendidas bacterias eliminadas por calor en solución salina normal a un $OD_{650}=0,600$. Las bacterias en 5 mls de la suspensión se granularon por centrifugación (aproximadamente 1800 X g, 15 minutos, 10-15°C). El sobrenadante fue desechado y el pelete fue suspendido de nuevo en 12 mls de metanol (MeOH). Fueron distribuidos cien microlitros de la suspensión en MeOH en cada pocillo de Nunc Maxisorp Stripwells. El MeOH se dejó evaporarse, fijando las bacterias al plástico. Los *stripwells* cubiertos de bacterias fueron almacenados en bolsas de plástico y usados 2 meses después de la preparación.

Para la evaluación de anticuerpos, las placas revestidas de bacterias fueron lavadas una vez con PBS y los sitios reactivos no específicos en las bacterias fueron bloqueados por la adición de 120 μ l/pocillo de una solución de albúmina de suero bovino al 1 % (BSA) en PBS. Después de una incubación de 30-60 minutos, los pocillos fueron lavados cuatro veces con PBS que contiene Tween-20 al 0,05 % (PBS-T). El anticuerpo, diluido en PBS-T, fue añadido entonces a los pocillos. Los sobrenadantes fueron probados en una dilución 1:2. El fluido ascítico y el anticuerpo purificado fueron probados en diluciones indicadas en las Tablas. Después de la adición del anticuerpo, los pocillos fueron incubados a temperatura ambiente durante 30-60 minutos en un ambiente sin corriente. Los pocillos fueron lavados otra vez cuatro veces con PBST y cada pocillo recibió 95 μ l del anticuerpo de detección: IgG de antirratón de conejo, conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) y diluido 1:4000 en PBS-T. Los anticuerpos de detección eran específicos para cadenas pesadas gamma de ratón, mu o alfa (números de catálogo de Zymed 61-6020, 61-6820 o 61-6720, respectivamente), como se indica en las Tablas.

Después de otra incubación de 30-60 a temperatura ambiente, los pocillos fueron lavados cuatro veces con PBS-T y cada pocillo recibió 100 μ l de la solución de sustrato de TMB de un componente (número de catálogo 50-76-05 de Laboratorios Kirkegaard y Perry). Los pocillos fueron incubados en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción fue parada por la adición de 80 μ l de la solución de parada de TMB (número de catálogo 50-85-05 de Laboratorios Kirkegaard y Perry) y fue determinada la absorbancia de cada pocillo a 450 nm usando un lector de placa de Vmax de Molecular Devices.

Inmunoensayo en los ALT: La reactividad de MAB 96-110 fue medida por el inmunoensayo en pocillos revestidos de los ALT. Los ALT fueron obtenidos de la Compañía Química Sigma y se diluyeron en PBS a 1 μ g/ml. Cien microlitros de la solución de 1 μ g/ml fueron distribuidos en replicados de Nunc Maxisorp Stripwells. El ALT fue incubado en los pocillos durante la noche a temperatura ambiente. El material desunido fue eliminado de los pocillos con cuatro lavados de PBS-T. Los pocillos no fueron bloqueados con BSA u otras proteínas. El anticuerpo, diluido en PBS-T, fue añadido entonces a los pocillos y el ensayo siguió como se describe antes.

Inhibición competitiva del anticuerpo de ALT: A fin de determinar la capacidad de ALT de inhibir la unión de MAB 96-110 a los pocillos revestidos de la Cepa Hay Fijada en MeOH, fue realizado un ensayo de inhibición competitivo. Los pocillos fueron revestidos en MeOH con la cepa Hay y fueron bloqueados con BSA como se describe antes. Cincuenta μ l de ALT de *S. mutans*, *S. aureus* o *S. faecalis* fueron añadidos a los pocillos por duplicado. Seis concentraciones diferentes de cada ALT fueron probadas (de 0,04 a 9,0 μ g/ml). Los ALT fueron diluidos en PBS-T para obtener las concentraciones deseadas. Inmediatamente después de la adición del ALT, fueron añadidos 50 μ l del MAB purificado 96-110 a 1 μ g/ml a cada pocillo. La dilución final de MAB 96-110 fue por lo tanto 0,5 μ g/ml. Los pocillos control sin inhibición sólo recibieron PBS-T y MAB sin ALT.

La unión de MAB 96-110 al ALT en la solución PBS-T causó un complejo de MAB/ALT que fue eliminado de la placa durante la etapa de lavado subsecuente. La interacción de MAB 96-110 con el ALT inhibió el anticuerpo de unir al ALT en la superficie de las bacterias y así redujo el número de moléculas MAB 96-110 unidas a la cepa Hay fijada en MeOH usada para revestir los pocillos. Como el número de moléculas MAB 96-110 unidas a la cepa Hay fijada en MeOH fue reducida, el nivel de unión del anticuerpo de detección (antirratón de conejo IgG-HRP) también fue disminuido por lo tanto, llevando a una reducción del desarrollo del color cuando se comparaba con pocillos en los cuales ningún ALT estaba presente.

Inmunoensayo con el método de la proteína A: A fin de evaluar el anticuerpo monoclonal 96-110 según la reactividad con *S. aureus* 5 y *S. aureus* 8, fue necesario modificar el procedimiento de inmunoensayo descrito anteriormente. Ambas cepas de *S. aureus* expresan a la proteína A en sus superficies. Como la proteína A se une fuertemente a la región constante de las cadenas pesadas de la globulina gamma, fue posible que se obtuvieran resultados falsos positivos debido a la unión no específica del anticuerpo 96-110 a la molécula de la proteína A. A fin de superar esta dificultad, los pocillos de inmunoensayo fueron revestidos de bacterias como se describe antes. Sin embargo, antes de la adición del anticuerpo 96-110 a los pocillos revestidos de las bacterias, el anticuerpo

monoclonal purificado (MAB) se hizo reaccionar con una solución de una proteína A recombinante conjugada a HRP y se diluyó 1:500 en PBS-T. Esta reacción se dejó seguir durante 30 minutos. Los pocillos fueron lavados cuatro veces con PBS-T y se añadieron a los pocillos 100 µl de la solución de proteína A-HRP-MAB. La presencia de proteína A-HRP del pretratamiento impidió que MAB se uniera a la proteína A en *S. aureus* 5 y 8. Además, la unión de la proteína A-HRP a la región constante de la cadena pesada no interfirió con el sitio de unión del anticuerpo en MAB, permitiendo así la evaluación de MAB en *S. aureus* y otras bacterias.

La Proteína A-HRP-MAB se dejó reaccionar en los pocillos revestidos durante 30-60 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos fueron lavados entonces con PBS-T y la solución del sustrato TMB fue añadida y el ensayo completado como se describe antes.

10 Ensayos de opsonización

Un ensayo de opsonización puede ser un ensayo colorimétrico, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo de consumo fluorescente o radiomarcado, un ensayo bactericida mediado en células, o cualquier otro ensayo apropiado conocido en la técnica que mida el potencial opsonico de una sustancia e identifique la inmunoglobulina altamente reactiva. En un ensayo de opsonización, los siguientes se incuban juntos: un agente infeccioso, una célula eucariótica y la sustancia opsonizante que se prueba, o una sustancia opsonizante más una sustancia que aumente la opsonización pretendida. Preferiblemente, el ensayo de opsonización es un ensayo bactericida mediado en células. En este ensayo *in vitro*, se incuban los siguientes juntos: un agente infeccioso, típicamente una bacteria, una célula fagocítica y una sustancia opsonizante, tal como la inmunoglobulina. Aunque se pueda usar cualquier célula eucariótica con capacidad fagocítica o de unión en un ensayo bactericida mediado en células, se prefiere un macrófago, un monocito, un neutrófilo o cualquier combinación de estas células. Pueden incluirse proteínas de complemento para promover la opsonización por ambos caminos clásicos y alternativos.

La capacidad opsonica de la inmunoglobulina es determinada a partir de la cantidad o el número de agentes infecciosos que permanecen después de la incubación. En un ensayo bactericida mediado en células, esto se lleva a cabo comparando el número de bacterias que sobreviven entre dos ensayos similares, sólo uno de los cuales contiene la inmunoglobulina opsonizante pretendida. O bien, la capacidad opsonica es determinada midiendo los números de organismos viables antes y después de la incubación. Un número reducido de bacterias después de la incubación en presencia de inmunoglobulina indica una capacidad opsonizante positiva. En el ensayo bactericida mediado por células, la opsonización positiva es determinada cultivando la mezcla de incubación en las condiciones de crecimiento bacterianas apropiadas. Cualquier reducción significativa en el número de bacterias viables que se comparan en las muestras antes y después de la incubación, o entre las muestras que contienen la inmunoglobulina y las que no la contienen, es una reacción positiva.

30 Ensayos de aclaración / ensayos protectores

Otro método preferido para identificar a agentes para el tratamiento o la prevención de una infección por bacterias Gram positivas emplea modelos letales de sépsis que miden la aclaración y la protección. Dichos agentes pueden ser la inmunoglobulina u otras sustancias antimicrobianas.

Un modelo animal particularmente útil comprende administrar un anticuerpo y un organismo Gram positivo a un animal inmunodeficiente (p. ej., uno inmaduro), seguido de evaluar si el anticuerpo reduce la mortalidad del animal o aumenta la aclaración del organismo del animal. Este ensayo puede usar a cualquier animal inmaduro, incluyendo conejo, cobaya, ratón, rata, o cualquier otro animal de laboratorio adecuado. El más preferido es el modelo de animal letal de rata lactante. Dicho modelo puede incorporar fácilmente un cuerpo ajeno infectado, tal como un catéter infectado, para imitar más apropiadamente el programa clínico. Un modelo alternativo utiliza a animales susceptibles adultos, tales como ratones de CF1.

La aclaración se evalúa determinando si la composición farmacéutica aumenta la aclaración del agente infeccioso del animal. Esto es determinado típicamente a partir de una muestra de fluido biológico, tal como la sangre, el fluido peritoneal o el fluido cerebroespinal. El agente infeccioso es cultivado a partir del fluido biológico de una manera adecuado para el crecimiento o la identificación del agente infeccioso que sobrevive. A partir de muestras de fluido tomadas durante un período de tiempo después del tratamiento, cualquier experto en la técnica puede determinar el efecto de la composición farmacéutica en la capacidad del animal de limpiar el agente infeccioso. Se pueden obtener otros datos adicionales midiendo durante el período de tiempo, preferiblemente un período de días, la supervivencia de animales a los cuales es administrada la composición farmacéutica. Típicamente, son utilizados ambos juegos de datos. Los resultados se consideran positivos si la composición farmacéutica aumenta la aclaración o disminuye la mortalidad. En situaciones en las cuales hay una mayor aclaración del organismo, aunque los animales de ensayo todavía fallezcan, todavía es indicado un resultado positivo.

55 **Ejemplo 1**

La producción de hibridomas y anticuerpos monoclonales

Para producir los anticuerpos monoclonales que fueron dirigidos contra las proteínas superficiales de *S. epidermidis* y que eran opsonicos y protectores para *S. epidermidis*, fueron inmunizados ratones con *S. epidermidis* entera, cepa Hay.

Una suspensión de *S. epidermidis* matada con calor fue ajustada a una densidad óptica (OD) de 0,137 en una longitud de onda de 650 nm cuando se midió a través de un paso de luz de 1 centímetro. Las bacterias de cinco ml

de la suspensión se granularon por centrifugación (aproximadamente 1800 X g, 10 minutos, temperatura ambiente). El sobrenadante fue desechado y el pelete fue suspendido de nuevo en 0,6 ml de PBS, que fue mezclado entonces con 0,9 ml de adyuvante de Freund completo (CFA). La emulsión resultante se usó como inmunógeno.

5 Fueron inmunizados subcutáneamente ratones BALB/c adultos, hembras, obtenidos de Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, Indiana) con 0,2 ml del inmunógeno descrito anteriormente. Los ratones recibieron una inmunización de refuerzo aproximadamente dos meses y medio después del antígeno preparado como se describe antes, salvo que el adyuvante de Freund incompleto (IFA) se usó como adyuvante en vez de CFA. Un refuerzo final por perfusión fue dado aproximadamente dos meses después de esto. Este refuerzo consistió en 1 ml de la suspensión de *S. epidermidis* (OD₆₅₀=0,137). Los ratones 8159 y 8160 cada uno recibió una inyección intraperitoneal de 0,5 ml de la suspensión. Cinco días más tarde, el bazo del ratón 8159 fue retirado y usado para la formación del hibridoma.

10 Se prepararon hibridomas por los métodos generales de Shulman, Wilde y Kohler, *Nature* **276**:269-270 (1978) y Bartal e Hirschhaut "Current Methods in Hybridoma Formation" en *Methods of Hybridoma Formation*, Bartal y Heishaut, eds., Humana Press, Clifton, Nueva Jersey (1987). Un total de $2,135 \times 10^8$ esplenocitos del ratón 8159 fueron mezclados con $2,35 \times 10^7$ células de mieloma del ratón SP2/0 (número de catálogo de ATCC CRL 1581) y fueron granulados por centrifugación (400 X g, 10 minutos a temperatura ambiente) y se lavaron en medio libre de suero. El sobrenadante fue eliminado hasta casi la sequedad y la fusión de la mezcla de células fue llevada a cabo en una centrifugadora de 50 ml estéril cónica por la adición de 1 ml de polietilenglicol (PEG; PM 1400; Boehringer Mannheim) por un período de 60-90 segundos. El PEG fue diluido por la adición lenta del medio sin suero en volúmenes sucesivos de 1, 2, 4, 8, 16 y 19 ml. La suspensión de células de hibridoma fue suavemente suspendida de nuevo en el medio y las células fueron granuladas por centrifugación (500 X g, 10 minutos a temperatura ambiente). El sobrenadante fue eliminado y las células fueron suspendidas de nuevo en medio RPMI 1640, suplementado con suero bovino fetal al 10 % desactivado con calor, hipoxantina 0,05 mM y timidina 16 μ M (medio HT). Cien μ l de las células de hibridoma fueron plantados en 760 pocillos de placas de cultivo de tejido de 96 pocillos. Ocho pocillos (columna 1 de la placa A) recibieron aproximadamente $2,5 \times 10^4$ células SP2/0 en 100 μ l. Las células SP2/0 sirvieron como control para eliminar por el medio de selección añadido 24 horas más tarde.

20 Veinticuatro horas después de la preparación de los hibridomas, fueron añadidos a cada pocillo 100 μ l de RPMI 1640, suplementado con sueros bovinos fetales al 10 % desactivados con calor, hipoxantina 0,1 mM, aminopterina 0,8 μ M y timidina 32 μ M (medio HAT).

30 Noventa y seis horas después de la preparación de los hibridomas, las células SP2/0 en la placa A, la columna 1 pareció estar muerta, indicando que el medio de selección HAT había eliminado con éxito las células SP2/0 no fusionadas.

35 Once días después de la preparación de los hibridomas, los sobrenadantes de todos los pocillos fueron probados por ELISA por la presencia de anticuerpos reactivos con *S. epidermidis* fijado en metanol. Según los resultados de este ensayo preliminar, las células de 20 pocillos fueron transferidas a una placa de cultivo de 24 pocillos. Cuatro días más tarde, el sobrenadante de estos cultivos fue probado de nuevo por ELISA según la presencia de anticuerpos reactivos con *S. epidermidis* fijado en metanol. De estos sobrenadantes, uno (de la colonia 96-105CE11) era una IgG fuertemente reactiva (Tabla 1). Dos colonias (96-105FD4 y 96-105GB5) eran muy débilmente reactivas con IgG y una colonia 96-105HB10 era IgM débilmente reactiva. Los anticuerpos del isotipo de IgM no son tan deseables como IgG y el cultivo 96-105HB10 fue crio-conservado y no se examinó más.

40 Las cultivos 96-105 CE11, FD4 y GB5 fueron analizados de nuevo varios días más tarde y sólo CE11 mostró una respuesta fuerte (Tabla 2). Ninguna respuesta fue obtenida con los otros cultivos de células, y no se realizó ningún trabajo experimental más con ellos.

45 Para probar además la especificidad de este anticuerpo para *S. epidermidis*, fue realizado un ELISA de células enteras con varias bacterias (Tabla 3). Los anticuerpos de esta colonia unidos fuertemente a *S. epidermidis* (Hay) O.D. 1.090 y a un grado menor al Grupo B de estreptococos (GBS), pero no a *H. influenzae* (HIB +, con cápsula tipo b; HIB-sin cápsula tipable) o el tipo 14, neumococo (Pn 14).

50 Un clon de 96-105CE11 IF6 fue aislado y probado de nuevo y era una IgG-1 que reaccionó fuertemente con *S. epidermidis* (cepa Hay) en el ELISA de células enteras (Tabla 4). Este clon fue denominado entonces 96-110. Para determinar si 96-110 tenía las amplias características de unión se buscó y esto fue consecuente con la unión a la proteína superficial en *S. epidermidis* (cepa Hay) que se unió ampliamente al anticuerpo opsónico, se realizó un ELISA de células enteras contra varios estafilococos coagulasa negativos (Tabla 5). Utilizando 96-110 en fluido ascético, la fuerte unión en varias diluciones fue detectada para *S. epidermidis* tipo I, II, III, *S. hemolyticus* y *S. hominus*.

55 Además, fue purificado el MAB 96-110 sobre una columna de proteína G (Farmacia). Usando una modificación de ELISA de células enteras, la proteína A marcada con peroxidasa fue mezclada con MAB 96-110 purificado y luego se hizo reaccionar con *S. aureus* tipo 5 (SA5) y *S. aureus* tipo 8 (SA8) obtenido del ATCC con número de entrada 12602 y 12605, respectivamente. Ambos serotipos de *S. aureus* reaccionaron fuertemente con el MAB 96-110 (Tabla 6). En los estudios anteriores de los inventores ya que se encontró que la absorción con *S. epidermidis* (cepa Hay) podría disminuir la actividad opsónica de IgG y los anticuerpos opsónicos generados contra Hay reaccionaron con una proteína superficial del Hay, los inventores pensaron que esto todavía era consecuente con un MAB a la proteína superficial que se trataba de caracterizar. Este descubrimiento también fue importante ya que los tipos 5 y

8, *S. aureus*, son serotipos comúnmente asociados a infecciones humanas. Usando este ensayo de proteína A, el MAB al neumococo tipo 14 no demostró la unión a *S. aureus*.

5 Por lo tanto, los inventores han identificado a una IgG de ratón, el MAB generado contra *S. epidermidis* (cepa Hay) que se une a la superficie tanto de estafilococos de coagulasa positivos como de coagulasa negativos de bacterias Gram positivas. Dicho anticuerpo sería valioso para prevenir o tratar infecciones de cocos Gram positivo previniendo la unión de bacterias a células epiteliales o cuerpos extraños, aumentando la opsonización y la protección de la infección y reduciendo (desmodulando) la respuesta inflamatoria.

TABLA 1

Resultados de inmunoensayo, Sobrenadantes de 96-105 en S. Hay fijado en Metanol

10

Colonia ID	Detección específica para:		
	G	A	M
PBS-F	0,070	0,080	0,050
CE11	0,788	0,065	0,056
EB5	0,079	0,065	0,053
EE5	0,084	0,069	0,055
FD4	0,089	0,067	0,059
FG4	0,087	0,065	0,065
FG8	0,090	0,060	0,062
FF9	0,095	0,062	0,059
GE4	0,074	0,067	0,059
GB5	0,155	0,077	0,078
GB6	0,073	0,062	0,053
GC6	0,069	0,062	0,052
GC9	0,076	0,062	0,053
GB10	0,075	0,064	0,102
HG2	0,195	0,067	0,059
HG3	0,079	0,066	0,060
HE4	0,076	0,073	0,065
HG4	0,077	0,101	0,061
HG5	0,077	0,062	0,058
HC8	0,083	0,064	0,057
HB10	0,070	0,064	0,223
AC4 IID10*	0,065	0,066	0,069

*Anticuerpo monoclonal reactivo con la proteína Hib D.

TABLA 2
Resultados de Inmunoensayo, Sobrenadantes de 96-105 en S. Hay fijado en Metanol

Colonia ID	Detección específica para:		
	G	A	M
Buffer	0,052	0,045	0,045
CE11	0,933	0,049	0,046
FD4	0,073	0,054	0,051
GB5	0,050	0,040	0,036

5

TABLA 3
Resultados de inmunoensayo, sobrenadantes de 96-105 en bacterias fijadas en metanol

Colonia ID	Detección Anticuerpo	Hay	Hib+	Hib-	GBS	
Pn14						
CE11	gamma-específico	1,090	0,106	0,068	0,304	0,063
FE11	gamma-específico	0,167	0,084	0,068	0,112	0,053
Buffer	gamma-específico	0,048	0,075	0,056	0,070	0,053

Varias colonias de 96-105 no clonadas.

10

TABLA 4
Ensayo de 96-105 CE11 IF6 en varias bacterias

Anticuerpo	Antígeno	Dilución	Isotipo	Hay	Pn14
PBS-T				0,072	0,064
96-105CE11-IF6	Hay	2	IgG-1, k	1,608	0,099
		4		1,184	0,087
		8		0,846	0,069
		16		0,466	0,074

TABLA 5
Detección de bacterias de anti-Hay monoclonal* en ELISA de células enteras

Anticuerpo	Dilución	Staph. Hay	Staph. Epi I	Staph. Epi II	Staph. Epi III	Staph. Hemmolyt.	Staph. Hominus
Tampón		0,056	0,063	0,066	0,055	0,058	0,074
Ascitos 96-110	100	1,448	2,334	1,524	1,241	1,197	0,868
	400	1,325	2,542	0,746	0,425	0,830	0,422
	1600	1,087	2,452	0,369	0,176	0,680	0,185
	6400	0,930	2,430	0,195	0,089	0,602	0,110
	25600	0,674	1,672	0,113	0,069	0,647	0,081

*Anti-Hay monoclonal de fluido ascético no purificado

*Anti-Hay monoclonal de fluido ascético no purificado

5

TABLA 6
Detección de SA5, SA8 y S. Hay fijado en metanol por Proteína A utilizando anti-Hay monoclonal purificada

Dilución anti-Hay	ATCC SA5	ATCC SA8	USU Hay
500	1,329	3,345	3,017
1000	1,275	2,141	2,266
2000	0,873	1,016	1,487
4000	0,333	0,491	0,951
8000	0,159	0,232	0,490
16000	0,132	0,149	0,331
Ratón 1000 Normal	0,101	0,090	0,082
Tampón	0,102	0,113	0,152
Reserva anti-Hay purificada = 1,63 mg/ml			

Ejemplo 2

10 Actividad opsonica del anticuerpo monoclonal

Los anticuerpos que se unen a un antígeno pueden no aumentar necesariamente la opsonización o aumentar la protección de la infección. Por lo tanto, fue usado un ensayo bactericida mediado de neutrófilos para determinar la actividad funcional del anticuerpo frente a *S. epidermidis*. Los neutrófilos fueron aislados de sangre venosa adulta por sedimentación de dextrano y centrifugación por densidad ficoll-hypaque. Los neutrófilos lavados fueron añadidos a pocillos de fondo redondo de placas de microtítulo (aproximadamente 10^6 células por pocillo) con aproximadamente 3×10^4 de bacterias de fase mid-log (Hay de *S. epidermidis*, ATCC 55133). Fue usado suero de cordero recién nacido (10 μ l), protegido para asegurar la ausencia del anticuerpo frente a *S. epidermidis*, como una fuente de complemento activo.

15

5 Fueron añadidos cuarenta microlitros de inmunoglobulina (o suero) en varias diluciones y las placas fueron incubadas a 37°C con agitación constante y vigorosa. Las muestras de 10 µl fueron tomadas de cada pocillo a tiempo cero y después de 2 horas de la incubación. Cada una fue diluida, agitada enérgicamente para dispersar las bacterias, y cultivada en placas agar-agar de sangre durante la noche a 37°C para cuantificar el número de bacterias viables. Los resultados son presentados como una reducción en el tanto por ciento de los números de colonias bacterianas observadas comparado con las muestras control.

10 Ya que el MAB 96-110 se unía tanto a estafilococos coagulasa positivo como a coagulasa negativo, fueron realizados estudios opsónicos para determinar si MAB aumentaba la fagocitosis y la eliminación de ambos grupos de estafilococos. En una dilución 1:80, el MAB aumentó la opsonización y la eliminación de estafilococos coagulasa negativos (*S. epidermidis*) al 100 %, comparado con el 49,5 % con C' y PMN solo (Tabla 7). El estafilococo coagulasa positivo también mostró una mayor fagocitosis en la dilución 1:10 y 1:40 (83,3 % y 78,9 % respectivamente) comparado con el 53,7 por ciento con C' y PMN solo. En la dilución 1:80, la actividad opsónica contra *S. aureus* fue disminuida al 61 %.

15 Estos datos muestran que no sólo el MAB se une a la superficie tanto de estafilococos coagulasa positivos como coagulasa negativo, sino que tiene una actividad funcional y puede aumentar la fagocitosis y la eliminación de estas bacterias. Dicho anticuerpo sería capaz de promover la aclaración de estafilococos que han invadido a un huésped y sería un agente terapéutico útil.

TABLA 7
Ensayo opsónico

20 **Anticuerpo: M X Hay purificado, 96-110**

Descripción del grupo	Dilución Ab	% <i>S. epidermidis</i> eliminado	% <i>S. aureus</i> eliminado
C' solo		0,0	0,0
PMN solo		0,0	0,0
PMN + C' No Ab		49,5	53,7
PMN + Ab + C'	10	-	83,3
	40	-	78,9
	80	100,0	61,0

Ejemplo 3

Eficacia protectora *in vivo*

25 El anticuerpo opsónico guarda correlación con una mayor protección de infecciones estafilocócicas, como se muestra en la serie reciente de solicitudes de Fischer y la patente publicada descrita anteriormente. Para demostrar además que MAB puede aumentar la supervivencia frente a infecciones tanto con estafilococos coagulasa negativo como coagulasa positivo, fueron llevados a cabo estudios usando modelos de infección letales.

30 Fueron inyectadas ratas Wistar de dos días con 10^6 de *S. aureus* (tipo 5, ATCC 12605) subcutáneamente sólo cefalado a la cola. Aproximadamente 30 minutos antes y 24 y 48 horas después de la infección, se administraron 0,2 ml de MAB 96-110 (~320 µg) IP. Se les administró a los animales control un volumen igual de solución salina o un MAB control no dirigido contra estafilococos. Todos los animales fueron vigilados diariamente durante cinco días para determinar su supervivencia.

35 El MAB 96-110 aumentó la supervivencia en este modelo neonatal letal de sépsis de estafilococo coagulasa positivo (figura 3): el 8/15 sobrevivió después del tratamiento con MAB 96-110, y 0/10 sobrevivió con el MAB control o 2/25 con el tratamiento salino.

40 De una manera similar, aumentó la supervivencia del MAB 96-110 en ratones adultos infectados por estafilococos coagulasa negativo. Se les administró a ratones CF1 adultos 0,5 ml de *S. epidermidis* (Hay) IP ($3,5 \times 10^9$ bacterias). Aproximadamente 24 horas y 2 horas antes y después de la infección de 24 horas, se administró 320 µg de MAB 96-110 a un grupo de ratones y se comparó con un segundo grupo infectado de la misma manera, pero no tratados con el anticuerpo. Todos los animales fueron seguidos 5 días para determinar la supervivencia. Aproximadamente 23 horas después de la infección, el 70 % de los animales tratados con MAB 96-110 estaban vivos comparado con el 20 % de animales a los que no se les administró el anticuerpo (figura 4). Cuando el estudio fue terminado el 50 % de los animales de MAB permaneció vivo comparado con sólo el 10 % de los controles.

45 Así, el MAB 96-110 podría aumentar la supervivencia en infecciones estafilocócicas coagulasa negativas y coagulasa positivas letales. Este aumento ocurrió en un modelo adulto y un modelo inmunodeficiente (sistema inmunológico neonatal inmaduro).

Ejemplo 4

Selección del péptido: Enriquecimiento de bibliotecas de fago fd-tet de 6meros y 15meros aleatorios

Se hizo un enriquecimiento de bibliotecas fago fd-tet de 6meros y 15meros amplificada aleatoria contra el anticuerpo 96-110 para proporcionar poblaciones de 6 y 15 péptidos de longitud de aminoácidos que reaccionaban específicamente con el anticuerpo 96-110. Las bibliotecas originales fueron adquiridas de George P. Smith, División de Ciencias Biológicas, Universidad de Misuri, Colombia, Misuri. A fin de usarla para enriquecimientos, el anticuerpo 96-110 se reticuló con biotina usando el kit de reticulación del éster de Sulfo-NHS-biotina siguiendo el protocolo de los fabricantes (Pierce Chemical Co.).

Para la primera ronda de enriquecimiento, fueron revestidas placas petri de 35 mm de poliestireno (Costar) con estreptavidina incubando las placas durante la noche a 4°C agitando suavemente con NaHCO₃ 100 mM y 10 µg de estreptavidina. La estreptavidina fue desechada entonces y las placas se rellenaron de solución de bloqueo (NaHCO₃ 0,1 M, 5mg/ml de BSA dializado, 0,1 µg/ml de estreptavidina) y se incubaron durante 1 hora a 4°C. El protocolo siguiente fue seguido entonces: Lavar las placas seis veces con TBS/Tween (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,5 % v/v). Incubar las placas durante la noche a 4°C agitando suavemente con 400 µl de TBS/Tween que contiene 1 mg/ml BSA dializado y 10 µg del anticuerpo 96-110 biotinilado. Añadir 4 µl de biotina 10 mM y se deja incubar 1 hora a 4°C agitando suavemente. Lavar las placas seis veces como se mencionaba antes. Añadir 400 µl de TBS/Tween en cada placa, añadir 4 µl de biotina 10 mM y añadir aproximadamente 5 µl de la biblioteca fago fd-tet de 6mero o de 15mero amplificado (en 1x10¹⁴ vir/ml). Mover suavemente las placas durante 4 horas a 4°C. Verter el fago y lavar diez veces con TBS/Tween. Incubar las placas a temp. ambiente con 400 µl de tampón elución (HCl 0,1N, pH ajustado a 2,2 con glicina, 1 mg/ml de BSA) durante 10 minutos con agitación suave. Retirar el eluato a un concentrador de Centricon 30 (Amicon) y cambiar el tampón con TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) y concentrado a un volumen de aproximadamente 100 µl. Amplificar el eluato mezclando 100 µl de eluato con 100 µl de células K91 de caldo enorme y dejando que el fago infecte a las células durante 10-30 min. Pipetear la mezcla de infección en 20 ml de medio NZY precalentado (10g NZ amine A, 5g de extracto de levadura, 5g de NaCl, 1 litro de agua, ajustado a pH 7,5, autoclave) conteniendo 0,2 µg/ml de tetraciclina. Agitar enérgicamente a 37°C durante 30-60 minutos. Añadir 20 µl de 20 mg/ml de la reserva de tetraciclina al matraz. Quitar una pequeña muestra para titular en las placas y permitir que el matraz se agite enérgicamente durante toda la noche a 37°C. Calcular la producción de bioenriquecimiento utilizando el número de colonias contadas con las placas de titulación desde la infección de amplificación y el número de fago de entrada al principio del enriquecimiento. Este número debería ascender a al menos aproximadamente el 10-5 %. Centrifugar 20 ml del cultivo durante 10 minutos a 5 000 revoluciones por minuto, luego durante 10 minutos a 10 000 revoluciones por minuto; verter el sobrenadante doblemente limpiado en un tubo limpio que contiene 3ml de PEG/NaCl (PEG 8000 al 16,7 %, NaCl 3,3M). Mezclar bien y dejar incubar durante toda la noche a 4°C. Centrifugar el tubo 15 minutos a 10.000 revoluciones por minuto, desechar el sobrenadante y disolver de nuevo el pelete del fago en 1 ml de TBS. Recoger el fago suspendido de nuevo en un tubo eppendorf de 1,5 ml, clarificar la suspensión por centrifugación, y añadir 150 µl de PEG/NaCl. Dejar incubar en hielo durante 1 hora. Microcentrifugar el tubo 10 minutos, desechar el sobrenadante, y disolver de nuevo el fago en 200 µl de TBS.

La segunda y tercera ronda de enriquecimiento se realiza del mismo modo. El fago eluido y amplificado (100 µl) del enriquecimiento anterior se preincuba con anticuerpo biotinilado 96-110 (100nM para la segunda ronda; 0,1 nM para la tercera ronda) durante la noche a 4°C. 400 µl de TBS/Tween son añadidos a la mezcla y se pipetea en las placas revestidas de estreptavidina (preparadas como se dice antes) y luego se incuba con agitación suave a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las placas se lavan entonces, se eluyen y se amplifican como se dice antes. El fago de entrada y el resultante se titulan para determinar la producción de bioenriquecimiento.

Ejemplo 5

Poblaciones de fago resultantes de la secuenciación para identificar las secuencias consenso

Después de la tercera ronda de enriquecimiento, las placas de infección tituladas se usan para escoger 20 colonias aisladas solas para cada biblioteca. Las colonias se cultivan durante la noche en 5ml de medio de NZY que contiene 40 µg/ml de tetraciclina. Se extrae el ADN de la forma replicativa de cada cultivo usando el kit preparatorio rápido Qiaplasmid (Qiagen Inc) siguiendo el protocolo del fabricante. Los medios sobrenadantes se guardan de reserva de fago para usarlo en el Ejemplo 4. 2,5 µl de cada muestra de ADN de RF son añadidos a una reacción que contiene 3,5 pmol de cebador de CLC502 (5'-TGAATTTTCTGTATGAGGTTT-3') (SEQ ID NO 3), 8 UI de mezcla de secuenciación de Prizm (ABI Inc) QS a 20 µl con agua y se amplifica siguiendo el protocolo de los fabricantes. Las secuencias acertadas son traducidas y alineadas. 18 secuencias que resultan para el enriquecimiento de la biblioteca de 6mer son puestas en una lista en la figura 5. 18 secuencias que resultan para el segundo experimento de enriquecimiento de la biblioteca de 15mero se muestran en la figura 6. 17 secuencias que resultan para el primer experimento de enriquecimiento de la biblioteca de 15mero se muestran en la figura 7. Una lista maestra fue compilada de las secuencias peptídicas comunes resultantes de todos los enriquecimientos (figura 8) con la frecuencia de aparición mostrada a la derecha de cada secuencia. Las partes consenso de las secuencias están marcadas en lista maestra (figura 8).

60

Ejemplo 6

El fago EIA comparando con la 3ª ronda de reactividad específica de aislados de fago respecto al anticuerpo 96-110

Fueron amplificadas las reservas de fago de medios salvados para cada una de las secuencias peptídicas comunes resultantes como se dice antes. Las preparaciones de fago amplificadas fueron cuantificadas por AbS269 y se diluyeron a 1×10^{13} vir/ml y se diluyeron en serie 1,2 siete veces. Una placa de poliestireno de 96 pocillos fue revestida de 2 µg/ml de estreptavidina en NaHCO₃ 0,1 M durante toda la noche a 4°C. Las placas fueron vaciadas y bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente con la solución de bloqueo de fago, 100 µl/pocillo. El protocolo siguiente fue seguido entonces. Los pocillos fueron lavados tres veces con TBS/Tween. Se incubaron durante la noche a 4°C con 0,2 µg/ml de 96110 biotinilado en solución de bloqueo de fago, 100 µl/pocillo. Los pocillos fueron lavados tres veces con TBS/Tween. Se incubaron durante la noche a 4°C con fago diluido en serie, 100 µl/pocillo. Se lavaron los pocillos tres veces con TBS/Tween. Se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con anti-fago-HRP policlónico 1:5000 de cabra. Se lavan los pocillos tres veces con TBS/Tween. Se desarrollaron con 100 µl de sustrato ABTS (Kirkegaard Perry) durante 10-15min y se leyó la absorbancia (402 nm) en un espectrofotómetro según el protocolo del fabricante. Las señales de densidades ópticas de cada fago aislado en $6,25 \times 10^{11}$ vir/ml son comparadas en la figura 9. Los dos aislados que proporcionan mayores señales son: 15mer2.12 WRMYFSHRHAHLRSP (SEQ ID NO:1) 15mer 2.1 WHWRHRIPLQLAAGR (SEQ ID NO:2)

Ejemplo 7

Anticuerpos contra el ácido lipoteicoico (ALT)

Como se muestra antes, los inventores identificaron dos péptidos que reaccionaron con MAB 96-110. Sin embargo, después de identificar los péptidos, las secuencias no equivalían a ninguna proteína conocida. Así los inventores comenzaron a considerar a otros candidatos de antígeno posibles. Estuvieron sorprendidos de encontrar que MAB 96-110 se unía fuertemente a ALT de varias bacterias Gram positivas, tales como *S. mutans*, *S. aureus* y *S. faecalis* (Tabla 8). Además, en un ELISA, cuando los pocillos revestidos de *S. epidermidis* (cepa Hay) se hicieron reaccionar con MAB 96-110 inhibido por concentraciones variadas de ALT (de *S. mutans*, *S. aureus* y *S. faecalis*), ocurrió la reducción de la unión de MAB (Tabla 9). La inhibición de la unión de MAB 96-110 fue mayor a la concentración más alta del inhibidor ALT (9 µg/ml para cada ALT) y varió según que ALT bacteriano fue usado (inhibición del 52 % con *S. mutans*, del 40,6 % con *S. aureus* y del 38,2 % con *S. faecalis*).

También fue analizado el MAB 96-110 que se unía a ALT de *S. pyogenes* (estreptococo grupo A) y varios tipos M de estreptococos del grupo A. MAB mostró una unión fuerte al ALT y también se unió a los diferente tipos M siendo la unión más fuerte la de M1 y M3 (Tabla 10).

Los inventores se sorprendieron de encontrar un anticuerpo que se unió a ALT y aumentó la opsonización tanto para estafilococos coagulasa negativo como coagulasa positivo *in vitro* y aumentó la supervivencia en modelos letales de sépsis estafilocócica (coagulasa negativo y coagulasa positivo), *in vivo*. Esto es particularmente sorprendente porque las bacterias en cada modelo fueron inyectadas sistémicamente (SQ o IP) y evitaron las barreras epiteliales (piel o membranas mucosas) donde se piensa que el ALT actúa posiblemente como un factor de adhesión para las bacterias a las células epiteliales.

Además, esta fuerte reactividad anti-ALT proporcionará un método para bloquear la unión de bacterias que llevan ALT a las células epiteliales y prevenir la colonización de patógenos importantes, tales como el estafilococos, estreptococos grupo A, *S. faecalis* (enterococos) y *S. mutans*. Ya que ALT induce las citoquinas proinflamatorias, tales como TNF, IL-6 e interferón gamma, los MAB con la unión de anti-ALT fuerte también tendrán una acción antiinflamatoria y modularán la producción de citoquina secundaria a bacterias que llevan ALT. Podrían ser diseñados y producidos anticuerpos anti-ALT o vacunas para modular la producción de citoquina y la inflamación en tejidos y prevenir los efectos adversos de estas citoquinas proinflamatorias.

TABLA 8**Reactividad del MAB 96-110 anti-Hay en pocillos revestidos de varios ALT**

Anticuerpo ID	Concentración o Dilución	LTA de <i>S. mutans</i>	LTA de <i>S. aureus</i>	LTA de <i>S. faecalis</i>
Tampón	-	0,145	0,172	0,140
Anti-Hay	0,9 µg/ml	3,899	3,253	3,153
MAB	0,3 µg/ml	3,523	2,824	2,769
96-110	0,1 µg/ml	2,023	2,421	2,133
	0,033 µg/ml	2,143	1,590	1,539
	0,011 µg/ml	1,396	0,998	0,832

TABLA 9
Inhibición del MAB 96-110 de anti-Hay con ALT de diferentes bacterias Gram positivas

LTA Inhibidor ($\mu\text{g/ml}$)	LTA <i>S. mutans</i>	LTA <i>S. aureus</i>	LTA <i>S. faecalis</i>
9	0,298	0,360	0,140
3	0,449	0,434	0,496
1	0,549	0,538	0,545
0.37	0,558	0,526	0,549
0.12	0,509	0,735	0,582
0.04	0,574	0,614	0,671
0	0,621	0,607	0,648

NOTAS:

1. Los pocillos fueron revestidos del Hay fijado en metanol.
2. Los pocillos fueron bloqueados con BSA al 1 % en PBS.
3. El anti-Hay monoclonal fue usado a una concentración final de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ y reaccionó con inhibidores en las concentraciones indicadas en la Tabla.
4. La detección era con un antirátón de conejo específico de gamma.
5. El sustrato era TMB.

5

TABLA 10
Reactividad de MAB 96-110 en Strep Grupo A fijado en metanol entero

Anticuerpo ID	Dilución o Conc.	GAS* Tipo 1 N°. 12344	GAS Tipo 3 N°. 21546	GAS Tipo 18 N°. 12357	GAS Tipo 24 N°. 10782	Respuesta en LTA piogenes
Tampón		0,511	0,161	0,234	0,148	0,075
Anti-Hay MAb	0,3 $\mu\text{g/ml}$	1,377	1,113	0,844	0,566	--
Anti-Hay Mab	0,1 $\mu\text{g/ml}$	1,016	0,553	0,555	0,402	2,228

*Todos los estreptococos del Grupo A (GAS) de ATCC (números de entrada mencionados anteriormente); las placas fueron revestidas con bacterias fijadas con MeoH y se leyeron a los 15 minutos.

Ejemplo 8

10 Humanización del anticuerpo anti-Staph 96-110 Clonación de los cDNA de la región variable de 96-110

La célula de hibridoma que produce el anticuerpo 96-110 fue obtenida como se describe antes. Fue descongelado un vial de células, fue lavado con medio libre de suero y luego se suspendido de nuevo en medios completos de IMDM (Mediatech) complementados con FBS al 10% (Irvine). El ARN total fue aislado de 1×10^8 células 96-110 usando el kit de aislamiento de ARN Midi (Qiagen) siguiendo el procedimiento del fabricante. El ARN fue disuelto en 15 Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM (pH8,4) conteniendo 0,03U/ μg de Inhibidor de RNase Prime (5'-3') a una concentración final de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

La figura 10 muestra la estrategia para clonar los fragmentos de genes de la región variable y la figura 11 enumera los cebadores oligonucleótidos usados. El ARN total de 96-110 (2 μg) fue convertido a cDNA usando la transcriptasa inversa Superscript II-MMLV (Life Technologies) y la preparación específica de la cadena pesada de ratón kappa (OKA57) y ratón (JS160-162) - según los procedimientos del fabricante. Los productos de síntesis de cDNA de primera cadena fueron purificados entonces usando un dispositivo concentrador de Centricon-30 (Amicon). De los 20 40 μl de cDNA recuperados, se usaron 5 μl como ADN plantilla para la PCR. Las reacciones de amplificación PCR típicas (100 μl) contenían ADN de plantilla, 50 pmoles de los cebadores apropiados (PMC12-15,55 y OKA57 para

5 cadenas delgadas, JSS1-4,8 y JS 160-162 para cadenas pesadas), 2,5 unidades de polimerasa ExTaq (PanVera), 1x tampón de reacción de ExTaq, 200 μ M de dNTP, $MgCl_2$ 1 mM. La plantilla fue desnaturada mediante una incubación inicial a 96°C durante 5 minutos. Los productos fueron amplificados mediante 15 ciclos termales de 55°C durante 30 segundos, 70°C durante 30 segundos, después 96°C durante 1 minuto seguido de 25 ciclos de paso de 70°C durante 1 minuto, después 96°C durante 1 minuto. Los productos PCR de las reacciones positivas fueron purificados usando el sistema de Purificación PCR de Wizard (Promega) según el procedimiento del fabricante.

10 Los productos PCR de la cadena pesada (aproximadamente 400 bp) fueron clonados después en un vector bacteriano para la determinación de la secuencia de ADN. Las uniones de los fragmentos PCR fueron realizadas en el vector de clonación de estilo T/A de PCR2.1 (Invitrogen) siguiendo los procedimientos del fabricante usando una proporción molar de inserto a vector de 3:1. Se usó una mitad (5 μ l) de las reacciones de unión para transformar las células XL2Blue ultracompetentes (Stratagene) según el procedimiento del fabricante. Los clones del plásmido que contienen insertos de ADN fueron identificados usando digestiones con enzimas de restricción diagnósticas con NcoI (Biolabs de Nueva Inglaterra). La secuencia de ADN de plásmidos (pJRS308) que contienen los insertos de tamaño apropiado (400bp) fue determinada después. La secuencia de ADN consenso final de las regiones variables de la

15 cadena pesada se muestra en la figura 12.

20 Los productos PCR de la cadena ligera fueron tratados diferentemente. La línea celular de hibridoma que expresa el anticuerpo 96-110 se hizo fusionando a los esplenocitos de ratón con la línea celular de mieloma SP20. La línea celular SP20 transcribe un pseudogen para la cadena ligera kappa. Además, la línea celular de hibridoma que expresa el anticuerpo 96-110 transcribe un segundo producto pseudogénico para una cadena ligera kappa que por lo visto surgió del complemento de esplenocito del acontecimiento de fusión del hibridoma. Este segundo transcrito de pseudogen se puede expresar del vector de expresión transfectado en células mamíferas, pero este producto de anticuerpo recombinante no se une a las células de HAY de Staph eliminadas por calor en un ELISA (véase el Ejemplo 9). Ambas de estas transcripciones de pseudogen, cuando se convierten en cDNA por RT-PCR, contienen un sitio de restricción Af/III. Por esta razón, los productos PCR sintetizados para la región variable de la cadena ligera fueron digeridos con Af/III y aquellos productos que no se cortaron fueron clonados entonces en el vector de clonación de estilo T/A pGEM T-Easy (Promega) usando los procedimientos del fabricante. Los clones candidato de la cadena ligera (pJRS319) fueron digeridos con EcoRI (Biolabs de Nueva Inglaterra) utilizando los procedimientos del fabricante para identificar a los clones que contienen insertos del tamaño apropiado (350bp). La secuencia de ADN consenso final de las regiones variables de la cadena ligera se muestra en la figura 12. Los aminoácidos codificados por estas secuencias dan positivo en los análisis de aminoácidos del extremo N-terminal de los fragmentos peptídicos de la cadena pesada y ligera producidos por la línea celular del hibridoma.

25 Las regiones variables de la cadena pesada y ligera fueron subclonadas después en un vector del plásmido de expresión mamífera pSUN 15 para la producción de moléculas de anticuerpo quiméricas recombinantes. La creación del vector de expresión fue un proceso extenso de unidos del fragmento de ADN y etapas de mutagénesis dirigida. El resultado fue un vector que expresaba ambas cadenas de anticuerpo con la transcripción conducida por el promotor CMV. La resistencia frente a neomicina sirve como un marcador seleccionable dominante para la transfección de células mamíferas. Además, se ha diseñado para permitir la clonación adecuada de cualquier región variable de la cadena ligera como el fragmento *EcoRV*BstBI, cualquier región variable de la cadena pesada como un fragmento *NruI*/*EcoRI*, y cualquier dominio constante de la cadena pesada como un fragmento *EcoRI*/*NotI*. Estos sitios de restricción fueron elegidos porque aparecen raramente (si aparecen alguna vez) en regiones variables de seres humanos y ratón. Hay un fragmento intrón J región/kappa de ratón fusionado a un exón kappa humano de modo que después del empalme post-transcripcional sea producida una cadena ligera kappa quimérica humana de ratón.

35 La estructura del vector fue el plásmido pCDNA3 (Invitrogen). Este plásmido fue cortado con HindIII/XhoI y fue insertado un fragmento de ADN de "policonector de cadena ligera" para crear el "vector de cadena ligera" indicado. Este conector contenía los sitios de restricción *HindIII*, *KpnI*, *ClaI*, *PmlI*, *EcoRV* *XmaI*, *BamHI* y *XhoI* para facilitar las etapas de clonación subsecuente para crear el plásmido pCDNA3.LCPL. Un fragmento de ADN de *SmaI*/*BclI* que contiene a una secuencia líder de la cadena ligera, el fragmento genómico de la cadena ligera kappa anti-CKMB, y 3' UTR fue clonado en los sitios *EcoRV*/*BamHI* de pCDNA3. LCPL. El intrón kappa de ratón, exón y 3' UTR en este fragmento fueron derivados de LCPXK2 recibido del doctor Richard Near (Near, RI *et al.*, 1990, *Mol Immunol.* 27:901-909). La mutagénesis fue realizada después para eliminar un sitio *NruI* (209), *MluI* (229) y *BstBI* (2962) e introducir un *NheI* (1229) y un *BamHI* (1214) para crear pCDNA3mut. LCPL.LCVK.

45 Un segundo "vector de la cadena pesada" fue construido a partir del plásmido pCDNA3mut. LCPL.LCVK sustituyendo la región de expresión de la cadena ligera (*HindIII*/*XhoI*) mediante un "policonector de la cadena pesada" que consistía en los sitios de restricción *HpaI*, *BspEI*, *EcoRV*, *KpnI*, y *XhoI*. Un fragmento de ADN Small *KpnI* contiene a una secuencia líder de la cadena pesada, el fragmento de la cadena genómica antiCKMB IgG2b. Un fragmento de oligo nucleótido *KpnI*/*Sall* que contiene un 3' UTR y un *NotI* corriente arriba del sitio *Sall* fue clonado posteriormente en el plásmido digerido del *KpnI*/*XhoI*, (desactivando el sitio *XhoI*) para crear el plásmido pCDNA3mut. HCPL.HCV2b.

60 Desde este punto, fueron creados dos vectores que no tenían ninguna de las secuencias de ADN de los dominios variables o constantes anti-CKMB. Esto se hizo cortando el plásmido pCDNA3mut. LCPL.LCVK con *EcoRV*/*XhoI* e insertando un fragmento oligonucleótido conector que contenía los sitios *EcoRV*, *BstBI* y *XhoI* para crear pSUN9. De un modo similar, el fragmento anti-CKMB en pCDNA3mut. El HCPL.HCV2b (*NruI*/*NotI*) fue sustituido por un

fragmento oligonucleótido conector que contenía los sitios *NruI*, *EcoRI* y *NotI* para crear pSUN10. Fue clonado entonces un dominio constante de la cadena ligera kappa humana en pSUN9 como un fragmento *BstB/XhoI*, y fue clonado un dominio constante de IgG1 humano en pSUN10 como un fragmento *EcoRI/NotI*. Un fragmento *BglIII/NheI* del vector de la cadena pesada humano fue clonado entonces en el vector de la cadena ligera humana con *BamHI/NheI* para crear pSUN15.

Este vector causa la producción de moléculas de anticuerpo recombinantes bajo el control de los promotores transcripcionales de CMV. Las moléculas de cadena pesada son construcciones de cDNA directas que fusionan la secuencia de la región variable directamente en el dominio constante de IgG1 humano. Las moléculas de cadena ligera, por otra parte, tienen a una región 3' del intrón kappa de ratón del fragmento de codificación de la región variable. Después de empalmar la región variable se fusiona a un exón de la región constante kappa humana. El marcador seleccionable para el vector en colas de mamíferos es neomicina (G418).

Fueron amplificados de nuevo por PCR fragmentos de genes de la región variable utilizando cebadores que adaptaban los fragmentos para clonarse en el vector de expresión (véase las figuras 12 y 14). El cebador directo de la cadena pesada (96110HF2) incluye una cola 5' que codifica el extremo C-término de la secuencia líder de la cadena pesada y un sitio de restricción *NruI* para la clonación, mientras que el cebador inverso de la cadena pesada (96110HB) añade un sitio de restricción de *EcoRI* de 3' para la clonación. El cebador directo de la cadena ligera (96110bLF) convierte el primer aminoácido de la secuencia 96-110 de la región variable de la cadena ligera de glutamina (Q) en ácido aspártico (D) vía la introducción de un sitio de restricción de *EcoRV* en el extremo N-término de la región variable de la cadena ligera para la clonación, mientras que el cebador inverso de la cadena ligera (96-110bLB) añade una secuencia de ADN de 3' para la unión del empalme de unión del exón región-kappa seguido de un sitio de restricción *BstB1* para la clonación.

Como el último aminoácido de la región variable de la cadena ligera es una arginina (R) que es un aminoácido muy raro en esta posición, el cebador inverso introduce una mutación de punto en el codón para el aminoácido 106 que lo convierte en lisina (L), mucho más común. Esto se hizo porque la unión del empalme en el vector de expresión para la cadena kappa fue derivada de una región J que codificaba a un lisina en esta posición. Ninguna mutación en la forma recombinante del anticuerpo sería esperada que cambiara las características de unión de los anticuerpos.

Fueron realizadas PCR como se describe antes excepto que se usaron en cada caso 10 ng de la plantilla del plásmido. Después de una incubación de 5 minutos a 96°C, los perímetros de la PCR fueron 35 ciclos termales de 58°C durante 30 segundos, 70°C durante 30 segundos, y 96°C durante 1 minuto.

El producto de PCR de la cadena pesada 96-110 (aproximadamente 400 bp) fue digerido con *NruI* y *EcoRI* (Biolabs de Nueva Inglaterra), purificado utilizando una columna de purificación PCR Qiaquick (Qiagen), como se describe por el fabricante, y se unió en *NruI* / *EcoRI* digerido y pSUN15 purificado en gel, causando el plásmido pJRS311 (véase la figura 13).

En este punto, fue digerido un fragmento de ADN de *BstBI/NotI* (Biolabs de Nueva Inglaterra) que contenía un fragmento de intrón de kappa J-kappa de ratón fusionado a un fragmento de exón kappa humano y fue purificado en gel a partir del vector tKMC180C1. Este fragmento se unió en la estructura de pJRS311 digerido con *BstBI/NotI* y se purificó en gel dando lugar al plásmido pJRS315 (véase la figura 13).

Esto era el plásmido en el cual fue clonado la región variable de la cadena ligera de 96-110. El producto PCR de la cadena ligera de 96-110 (aproximadamente 350 bp) fue digerido con *EcoRV* y *BstBI* (Biolabs de Nueva Inglaterra), se purificó utilizando una columna de purificación PCR Qiaquick (Qiagen), como se describe por el fabricante, y se unió en *EcoRV/Bs/BI* digerido y se purificó por gel pJRS315, dando lugar al plásmido pJRS326 (véase la figura 13).

Fue determinado que durante este proceso de clonación, ocurrió una delección de aproximadamente 200bp en la unión del intrón y exón de la cadena ligera de kappa. Para reparar esto, fue purificado en gel un fragmento de ADN idéntico (también un fragmento de restricción *BstBI/NotI*) a partir de pEN22 digerido y se unió en *BstBI/NotI* pJRS326 digerido y purificado en gel, dando lugar a la expresión final del constructo del plásmido pJRS334 (véanse las figuras 13 y 14). La secuencia de las regiones variables y líder y otras uniones fue verificada antes de la transfección a la célula mamífera.

Ejemplo 9

Producción pasajera del anticuerpo 96-110 ratón/humano quimérico recombinante

Fueron transfectados dos clones individuales del plásmido pJRS334 (pJRS334-1,-2) en células COS y CHO usando Superfectant (Qiagen) en 6 pocillos de células de cultivo de tejido como se describe por el fabricante. Después de tres días, el sobrenadante fue analizado según la producción del anticuerpo "humanizado" y según la capacidad del anticuerpo expresado de unirse al antígeno Staph eliminado por calor.

Los ensayos de producción de anticuerpo fueron preformados en tiras de 8 pocillos de placas de microtítulo de 96 pocillos (Maxisorp F8; Nunc, Inc) revestidas en una dilución 1:500 con el anticuerpo de IgG antihumano de cabra (Pierce) utilizando un tampón de revestimiento de bicarbonato, pH 8,5. Las placas son revestidas con película sensible a la presión (Falcon, Becton Dickinson) y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavan entonces una vez que con solución de lavado (imidazol/NaCl/Tween-20 al 0,4 %). 100 microlitros del sobrenadante del cultivo fueron aplicados entonces a los pocillos por duplicado y se dejó incubar durante 30 minutos en el rotador de placa a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas cinco veces con solución de lavado. Un conjugado anti

kappa-HRP humano de cabra (Southern Biotechnologies) fue diluido 1:800 en el diluyente de muestra / conjugado. Fueron añadidos 100 microlitros a las muestras, luego se incubaron en un rotador de placa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron como antes y luego se incubaron con 100 μ l/pocillo de sustrato que desarrolla ABTS (Kirkgaard & Perry Laboratories) durante 10-15 minutos en un rotador de placa a temperatura ambiente. La reacción fue parada con 100 μ l/pocillo de tampón de inactivación (Kirkgaard & Perry Laboratories) y fue determinado el valor de la absorbancia a 405 nm usando un lector ELISA de placa de microtítulo automatizado (Ceres UV900HI, Bioteck, Winooski, Vermón). Como control positivo, se usó un anticuerpo quimérico BC24 humanizado de ratón/humano. Este ensayo (véase la figura 15) demuestra que la transfección de células con esta construcción de plásmido hace que las células produzcan una molécula que contiene tanto a los dominios IgG humanos como kappa. Los sobrenadantes fueron analizados después según la capacidad de unirse de los anticuerpos expresados a Staph eliminado por calor. Los ensayos de actividad fueron preformados en tiras de 8 pocillos de placas de microtítulo de 96 pocillos (Maxisorp F8; Nunc, Inc) revestidas a 0,09 OD/pocillo con el material celular de Hay de Staph eliminado por calor suspendido en MeOH. Las placas se dejan destapadas y se incuban durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavan entonces una vez con PBS. Después fueron aplicados 100 microlitros del sobrenadante de cultivo a pocillos por duplicado y se dejó incubar durante 60 minutos en el rotador de placa a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas cinco veces con solución de lavado. El anti kappa-HRP humano de cabra fue diluido 1:800 en el diluyente de muestra / conjugado. Fueron añadidos 100 microlitros a las muestras, luego se incubaron en un rotador de placa durante 30 minutos a temperaturas ambiente. Las muestras se lavaron como antes y luego se incubaron con 100 μ l/pocillo de sustrato que desarrolla ABTS (Kirkgaard & Perry Laboratories) durante 10-15 minutos en un rotador de placa a temperatura ambiente. La reacción fue parada con 100 μ l/pocillo de tampón de inactivación (Kirkgaard & Perry Laboratories) y fue determinado el valor de la absorbancia a 405 nm usando un lector ELISA de placa de microtítulo automatizado (Ceres UV900HI, Bioteck, Winooski, Vermón). Como control positivo, se usó el anticuerpo monoclonal 96-110 del ratón original, y se analizó con un conjugado Fc-HRP antiratón de cabra a dilución 1:2000. Este ensayo (véase la figura 16) demuestra que la transfección de células con esta construcción de plásmido hace que las células produzcan una molécula que se une al antígeno celular de Hay de Staph.

Ejemplo 10

Producción estable del anticuerpo 96-110 de ratón/humano quimérico recombinante

El plásmido pJRS334-1 se transfectó en células NS/0 (obtenible de Baxter International) y células de CHO usando electroporación. El plásmido se linearizó con la digestión de restricción de PvuI. Fueron mezclados 25 microgramos de ADN del plásmido digerido con 1×10^7 de células en un volumen total de 800 microlitros en una cubeta de 4 centímetros y se sometieron a un pulso de 250mA, 9600microF. Las células fueron puestas en placas después de 24 horas en 10ml de medio no selectivo. Las células fueron diluidas entonces en placas de microtítulo de 96 pocillos. Cuando las colonias aparecieron, los sobrenadantes se analizaron para la producción del anticuerpo "humanizado" y según la capacidad que tiene el anticuerpo expresado de unirse al antígeno Staph eliminado por calor. Fueron realizadas la producción de anticuerpo y los ensayos de actividad para los transfectantes estable como se describe antes. Estos ensayos demuestran que la transfección de células con esta construcción de plásmido puede dar lugar a la producción de una línea celular estable que produce una versión quimérica humanizada del anticuerpo 96-110 del híbrido de ratón.

Ejemplo 11

Actividad opsónica

Habiendo producido un MAB anti-ALT quimérico para estafilococos, los inventores probaron su actividad funcional usando *S. epidermidis* como organismo estafilocócico representativo. La utilización el ensayo opsonofagocítico mediado por neutrófilos descrito de forma general en la sección de Materiales y Métodos, los inventores evaluaron la actividad opsónica del MAB calculando el tanto por ciento de bacterias eliminadas después de dos horas de incubación.

Fueron aislados neutrófilos, específicamente neutrófilos polimorfonucleares, a partir de sangre venosa adulta por sedimentación de dextrano y centrifugación por densidad ficoll-hypaque. Fueron añadidos los neutrófilos lavados a pocillos de fondo redondo de placas de microtítulo (aproximadamente 10^6 células por pocillo) con aproximadamente 3×10^4 mid-log de bacterias de fase (S. epidermidis Hay, ATCC 55133). Se usaron sueros humanos (10 μ l), seleccionado para asegurarse de la ausencia del anticuerpo a *S. epidermidis*, como fuente de complemento activo (C-Barb-Ex (1:4)).

Fueron añadidos cuarenta microlitros de inmunoglobulina a varias concentraciones (20 μ g/ml, 40 μ g/ml, 80 μ g/ml y 160 μ g/ml) y las placas se incubaron a 37°C con agitación constante y fuerte. Fueron tomadas muestras de 10 μ l de cada pocillo en el tiempo cero y después de 2 horas de incubación. Cada una fue diluida, agitada fuertemente para dispersar las bacterias, y cultivada en placas agar-agar de sangre durante toda la noche a 37°C para cuantificar el número de bacterias viables. Los resultados se presentan en la figura 17 como la reducción en tanto por ciento de los números de colonias bacterianas observadas comparado con las muestras control.

Comparado con PMN solo o PMN más el complemento, la adición de MAB aumentó marcadamente la actividad opsónica para el estafilococo en 20-160 μ g/ml). Estos datos demuestran que el MAB tiene una actividad funcional y

puede aumentar la fagocitosis y la eliminación de organismos estafilocócicos, como se representa por *S. epidermidis*.

Ejemplo 12

Eficacia protectora *in vivo*

5 Usando la sépsis estafilocócica letal en el ensayo de ratones adulto (descrito en el Ejemplo 3), los inventores compararon la protección entre el MAB de ratón original y el HuMAB quimérico. Se dieron a ratones CF1 adultos 0,5 ml de *S. epidermidis* (Hay) IP ($3,5 \times 10^9$ bacterias). Aproximadamente 24 horas y 1 hora antes de la infección, se les dieron 14 mg/kilogramo de cada MAB a un grupo de ratones, con un tercer grupo de ratones a los que se les dio sólo PBS. Todos los animales fueron seguidos durante 40 horas después de la exposición para determinar la supervivencia.

10 Como se muestra en la figura 18, aproximadamente 18 horas después de la infección, todos los animales control murieron mientras que ambos grupos de tratamiento mostraron una supervivencia del 100 %. A las 30 horas después de la infección, ambos grupos de tratamiento de MAB mostraron una supervivencia del 70 %. Al final del estudio, el grupo que recibió el MAB de ratón mostró mayor supervivencia que el grupo que recibió el MAB quimérico, pero ambos MAB aumentaron la supervivencia respecto a los controles de PBS.

15 Los inventores realizaron otros estudios con el MAB quimérico a una dosis de 18 mg/kg/dosis, 2 dosis dadas IP 24 y 1 hora antes de la infección (3×10^9 IP *S. epidermidis*, Hay). Como se muestra en la figura 19, el MAB quimérico aumentó la supervivencia.

20 Los inventores también evaluaron el efecto del MAB quimérico en la bacteremia en el modelo de sépsis letal de *S. epidermidis*. Los ratones CF-1 fueron infectados dos veces IP con la cepa Hay y el MAB quimérico. La bacteremia se expresa como el número de bacterias aisladas en agar-agar de sangre después de una dilución 1:1000. Como se muestra en la figura 20, el MAB quimérico redujo los niveles bacterianos en más de 2 log. Otros estudios demostraron que la bacteremia fue reducida a un mayor grado usando 40 mg/kg/dosis comparado con los 20 mg/kg/dosis aun si la supervivencia era comparable. Véase la figura 21.

25 Estos datos indican que el aumento de la cantidad de anticuerpo causaba una aclaración bacteriana mayor *in vivo*. Dicha respuesta es similar a la actividad opsonica mayor observada *in vitro* como se observa cuando el anticuerpo aumentaba de 20 µg/ml a 160 µg/ml en el ensayo opsonofagocítico mediado por neutrófilos (figura 17).

Ejemplo 13

Eficacia protectora *in vivo*

30 El efecto del MAB 96-110 quimérico fue analizado después en un modelo estafilocócico neonatal usando ratas de lactación con una infección de cuerpo ajeno. Fueron tratadas ratas Wistar de dos días con una emulsión lipídica (como es estándar en el cuidado de recién nacidos para fines alimenticios) 0,2 ml, IP al 20 % el día-1 y otra vez durante el día +1 y +2 para inducir un compromiso adicional del sistema inmunológico. En dos estudios, se inyectaron aproximadamente 5×10^7 de cuatro cepas diferentes de *S. epidermidis*, identificada más abajo en la

35 Tabla 11 SQ a través de un catéter plástico y el catéter fue dejado en su lugar bajo la piel. Se administraron 0,2 ml, o MAB 96-110, 0,2 ml (dosis de 50-60 mg/kg), IP 30 minutos antes y 24 horas después de la infección. Los animales fueron seguidos durante 5 días.

40 Como se muestra en la Tabla 11, en el estudio I. la supervivencia para los animales que recibieron MAB se amplió del 67 % al 83 %, con un promedio del 76 %, en contraste con el tratamiento de solución salina, que se amplió del 33 % al 50 %, con un promedio del 39 %. El estudio II mostró resultados aún más impresionantes. La supervivencia para los animales tratados con MAB estaba en el intervalo del 83 % al 100 %, con un promedio del 90 %, comparado con los controles salinos del 33 % al 50 %, con un promedio del 40 %. Los datos compilados para el estudio II se muestran en la figura 22.

TABLA 11

45 **El efecto de Hu96-110 en la supervivencia en un modelo de sépsis neonatal letal de *S. epidermidis***

Número de camada	Cepa de <i>S. epidermidis</i>	Anticuerpo monoclonal		Control de solución salina	
		Tratado	Supervivencia (%)	Tratado	Supervivencia (%)
Estudio I					
31	Haywood (tipo II) (clínico)	6	4 (67%)	6	2 (33%)
32	35984 (tipo I) (Prototipo)	5	4 (80%)	4	2 (50%)
33	Summer (48357) (clínico)	6	4 (67%)	6	2 (33%)

ES 2 363 689 T3

34	SE-360 (tipo III) (Prototipo)	6	5 (83%)	6	2 (33%)
35	Haywood (tipo II) (clínico)	6	5 (83%)	6	3 (50%)
TOTAL		29	22(76%)	28	11 (39%)
Estudio II					
36	Haywood (tipo II) (clínico)	6	6 (100%)	6	3 (50%)
37	35984 (tipo I) (Prototipo)	6	5 (83%)	6	2 (33%)
38	Summer (48357) (clínico)	6	6 (100%)	6	2 (33%)
39	SE-360 (tipo III) (Prototipo)	6	5 (83%)	6	2 (33%)
40	Haywood (tipo II) (clínico)	6	5 (83%)	6	3 (50%)
TOTAL		30	27 (90%)	30	12 (40%)
TOTAL DE AMBOS ESTUDIOS		59	49 (88%)	58	23 (40%)

5 Estos datos demuestran que el anticuerpo humano quimérico dirigido contra ALT es opsónico y aumenta la supervivencia contra estafilococos. Además, el anticuerpo promueve la aclaración de la forma de estafilococos de la sangre. Por tanto, el anticuerpo frente a ALT proporciona capacidades profilácticas y terapéuticas contra infecciones estafilocócicas y también tendrían capacidades profilácticas vacunas usando ALT o miméticos del péptido de ALT que inducen anticuerpos anti-ALT.

La memoria descriptiva y los Ejemplos sólo son ejemplares con los detalles de la invención reivindicada expuesta como sigue:

LISTADO DE SECUENCIA

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

5 (i) SOLICITANTE: HENRY JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE
 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: ANTICUERPOS MONOCLONALES Y QUIMÉRICOS, OPSÓNICOS Y PROTECTORES, ESPECÍFICOS PARA EL ÁCIDO LIPOTEICOICO DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 105

(iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

10 (A) DESTINATARIO: FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW, GARRETT & DUNNER, LLP
 (B) CALLE: 1300 I Street, NW
 (C) CIUDAD: Washington
 (D) ESTADO: DC
 (E) PAÍS: USA
 (F) CÓDIGO POSTAL: 20005-3315

15 (v) FORMA LEGIBLE INFORMÁTICA:

(A) TIPO DE MEDIO: disquete
 (B) ORDENADOR: PC IBM compatible
 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30

20 (vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT no asignada
 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: La adjunta en este documento

(viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:

25 (A) NOMBRE: Einaudi, Carol P.
 (B) NÚMERO DE REGISTRO: 32,220
 (C) NÚMERO DE REFERENCIA/DOCKET: 04995.0041-00304

(ix) INFORMACIÓN DE CONTACTO:

(A) TELÉFONO: 202-408-4000
 (B) TELEFAX: 202-408-4400

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

35 (A) LONGITUD: 15 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA:
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

Trp Arg Met Tyr Phe Ser His Arg His Ala His Leu Arg Ser Pro
 1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) TIPO DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

Trp His Trp Arg His Arg Ile Pro Leu Gln Leu Ala Ala Gly Arg
 1 5 10 15

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

TGAATTTTCT GTATGAGGTT T 21

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla –

20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..30

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

GGG GCT CAT GCG GAT AGG GTT TAT GGG GCC
 Gly Ala His Ala Asp Arg Val Tyr Gly Ala
 1 5 10

30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

30 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:5:

Gly Ala His Ala Asp Arg Val Tyr Gly Ala
 1 5 10

35 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (ix) PROPIEDAD:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 - (B) POSICIÓN: 1..30

5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

GGG ANT CAT GCG GAT AGG GTT TAT GGG GCC 30
 Gly Xaa His Ala Asp Arg Val Tyr Gly Ala
 1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 10 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:7:

Gly Xaa His Ala Asp Arg Val Tyr Gly Ala
 1 5 10

15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 57 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla –
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

20

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

25

(B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

GGG GCT TGG CAT TGG CGT CAT CGT ATT CCT CTT CAG CTT GCT GCT GGT 48
 Gly Ala Trp His Trp Arg His Arg Ile Pro Leu Gln Leu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

CGT GGG GCC 57
 Arg Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:9:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

Gly Ala Trp His Trp Arg His Arg Ile Pro Leu Gln Leu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Arg Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:10:

GGG GCT CGT CGG CAT GGT AAT TTT TCT CAT TTT TTT CAT CGG TCG TTG 48
 Gly Ala Arg Arg His Gly Asn Phe Ser His Phe Phe His Arg Ser Leu
 1 5 10 15

ATT GGG GCC 57
 Ile Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:11:

Gly Ala Arg Arg His Gly Asn Phe Ser His Phe Phe His Arg Ser Leu
 1 5 10 15

Ile Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:12:

GGG GCT TGG AAG GCT TTG TTT AGT CAT TCT TAT CGT CCT CGG GGT TCG 48
 Gly Ala Trp Lys Ala Leu Phe Ser His Ser Tyr Arg Pro Arg Gly Ser
 1 5 10 15

GCT GGG GCC 57
 Ala Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5 (A) LONGITUD: 19 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:13:

Gly Ala Trp Lys Ala Leu Phe Ser His Ser Tyr Arg Pro Arg Gly Ser
 1 5 10 15

Ala Gly Ala

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 57 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..57

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:14:

GGG GCT AGG CAT TGG CGT CAT CGT ATT CCT CTT CAG CTT GCT GCT GGT 48
 Gly Ala Arg His Trp Arg His Arg Ile Pro Leu Gln Leu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

CGT GGG GCC 57
 Arg Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 19 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:15:

Gly Ala Arg His Trp Arg His Arg Ile Pro Leu Gln Leu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Arg Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

10

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:16:

GGG GCT TGG CAT TGG CGT CAT CGT ATT CCT CTT CAG CTT GCT GCT GGT 48
 Gly Ala Trp His Trp Arg His Arg Ile Pro Leu Gln Leu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

CGT GGG GCC 57
 Arg Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:17:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

20

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:17:

Gly Ala Trp His Trp Arg His Arg Ile Pro Leu Gln Leu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Arg Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla –
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

30

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:18:

GGG GCT TGG CAT TGG CGT CAT CGT ATT CCT CTT CAG CTT GCT GCT GGT 48
 Gly Ala Trp His Trp Arg His Arg Ile Pro Leu Gln Leu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

CGT GGG GCC 57
 Arg Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:19:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:19:

Gly Ala Trp His Trp Arg His Arg Ile Pro Leu Gln Leu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Arg Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 57 pares de bases

15 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla –

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

20 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:20:

GGG GCT CAG GTG GCT GTT TTG TAT CCT CCT TTG GCT GAT GCT ACT GAG 48
 Gly Ala Gln Val Ala Val Leu Tyr Pro Pro Leu Ala Asp Ala Thr Glu
 1 5 10 15

CTT GGG GCC 57
 Leu Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:21:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:21:

Gly Ala Gln Val Ala Val Leu Tyr Pro Pro Leu Ala Asp Ala Thr Glu
 1 5 10 15

Leu Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:22:

GGG GCT CGT CGG CAT GGT AAT TTT TCT CAT TTT TTT CAT CGG TCG TTG 48
 Gly Ala Arg Arg His Gly Asn Phe Ser His Phe Phe His Arg Ser Leu
 1 5 10 15

ATT GGG GCC 57
 Ile Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:23:

Gly Ala Arg Arg His Gly Asn Phe Ser His Phe Phe His Arg Ser Leu
 1 5 10 15

Ile Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:24:

GGG GCT CGT CGG CAT GGT AAT TTT TCT CAT TTT TTT CAT CGG TCG TTG 48
 Gly Ala Arg Arg His Gly Asn Phe Ser His Phe Phe His Arg Ser Leu
 1 5 10 15

ATT GGG GCC 57
 Ile Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:25:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:25:

Gly Ala Arg Arg His Gly Asn Phe Ser His Phe Phe His Arg Ser Leu
 1 5 10 15

Ile Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 57 pares de bases

15 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

20 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:26:

GGG GCT TGG CGT ATG TAT TTT TCT CAT CGT CAT GCG CAT CTT CGT AGT 48
 Gly Ala Trp Arg Met Tyr Phe Ser His Arg His Ala His Leu Arg Ser
 1 5 10 15

CCT GGG GCC 57
 Pro Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:27:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:27:

Gly Ala Trp Arg Met Tyr Phe Ser His Arg His Ala His Leu Arg Ser
 1 5 10 15

Pro Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:28:

GGG GCT TGG CGT ATG TAT TTT TCT CAT CGT CAT GCG CAT CTT CGT AGT 48
 Gly Ala Trp Arg Met Tyr Phe Ser His Arg His Ala His Leu Arg Ser
 1 5 10 15

CCT GGG GCC 57
 Pro Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:29:

Gly Ala Trp Arg Met Tyr Phe Ser His Arg His Ala His Leu Arg Ser
 1 5 10 15

Pro Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:30:

GGG GCT TGG CGG AAG TAT TTT TCT TAT CAT CAT GCG CAT CTT TGT AGT 48
 Gly Ala Trp Arg Lys Tyr Phe Ser Tyr His His Ala His Leu Cys Ser
 1 5 10 15

CCT GGG GCC 57
 Pro Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:31:

Gly Ala Trp Arg Lys Tyr Phe Ser Tyr His His Ala His Leu Cys Ser
 1 5 10 15

Pro Gly Ala

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..57

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:32:

GGG GCT TGG CGT ATG TAT TTT TCT CAT CGT CAT GCG CAT CTT CGT AGT 48
 Gly Ala Trp Arg Met Tyr Phe Ser His Arg His Ala His Leu Arg Ser
 1 5 10 15

CCT GGG GCC 57
 Pro Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:33:

Gly Ala Trp Arg Met Tyr Phe Ser His Arg His Ala His Leu Arg Ser
 1 5 10 15

Pro Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:34:

GGG GCT TGG CGT ATG TAT TTT TCT CAT CGT CAT GCG CAT CTT CGT AGT 48
 Gly Ala Trp Arg Met Tyr Phe Ser His Arg His Ala His Leu Arg Ser
 1 5 10 15

CCT GGG GCC 57
 Pro Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:35:

Gly Ala Trp Arg Met Tyr Phe Ser His Arg His Ala His Leu Arg Ser
 1 5 10 15

Pro Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:36:

GGG GCT TGG CGT ATG TAT TTT TCT CAT CGT CAT GCG CAT CTT CGT AGT 48
 Gly Ala Trp Arg Met Tyr Phe Ser His Arg His Ala His Leu Arg Ser
 1 5 10 15

CCT GGG GCC 57
 Pro Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:37:

Gly Ala Trp Arg Met Tyr Phe Ser His Arg His Ala His Leu Arg Ser
 1 5 10 15

Pro Gly Ala

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:38:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 57 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- 20 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:38:

GGG GCT CGT CGG CAT GGT AAT TTT TCT CAT TTT TTT CAT CGG TCG TTG 48
 Gly Ala Arg Arg His Gly Asn Phe Ser His Phe Phe His Arg Ser Leu
 1 5 10 15

ATT GGG GCC 57
 Ile Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:39:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:39:

Gly Ala Arg Arg His Gly Asn Phe Ser His Phe Phe His Arg Ser Leu
 1 5 10 15

Ile Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla _
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:40:

GGG GCT TGG CAT TGG CGT CAT CGT ATT CCT CTT CAG CTT GCT GCT GGT 48
 Gly Ala Trp His Trp Arg His Arg Ile Pro Leu Gln Leu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

CGT GGG GCC 57
 Arg Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:41:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:41:

Gly Ala Trp His Trp Arg His Arg Ile Pro Leu Gln Leu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Arg Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:42:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:42:

GGG GCT CGT CGG CAT GGT AAT TTT TCT CAT TTT TTT CAT CGG TCG TTG	48
Gly Ala Arg Arg His Gly Asn Phe Ser His Phe Phe His Arg Ser Leu	
1 5 10 15	
ATT GGG GCC	57
Ile Gly Ala	

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:43:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:43:

Gly Ala Arg Arg His Gly Asn Phe Ser His Phe Phe His Arg Ser Leu
1 5 10 15
Ile Gly Ala

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:44:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 57 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- 20 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:44:

GGG GCT GAT TGG ATT ACT TTT CAT CGT CGT CAT CAT GAT CGT GTT CTT	48
Gly Ala Asp Trp Ile Thr Phe His Arg Arg His His Asp Arg Val Leu	
1 5 10 15	
TCT GGG GCC	57
Ser Gly Ala	

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:45:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:45:

Gly Ala Asp Trp Ile Thr Phe His Arg Arg His His Asp Arg Val Leu
 1 5 10 15

Ser Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:46:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:46:

GGG GCT GGT TGG ATT ACT TTT CAT CGT CGT CAT CAT GAT CGT GTT CTT 48
 Gly Ala Gly Trp Ile Thr Phe His Arg Arg His His Asp Arg Val Leu
 1 5 10 15

TCT GGG GCC 57
 Ser Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:47:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:47:

Gly Ala Gly Trp Ile Thr Phe His Arg Arg His His Asp Arg Val Leu
 1 5 10 15

Ser Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:48:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:48:

GGG	GCT	GGG	AAG	GCT	ATG	TTT	AGT	CAT	TCT	TAT	CGT	CAT	CGG	GGT	TCG	48
Gly	Ala	Gly	Lys	Ala	Met	Phe	Ser	His	Ser	Tyr	Arg	His	Arg	Gly	Ser	
1				5					10					15		
GCT	GGG	GCC														57
Ala	Gly	Ala														

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:49:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:49:

Gly	Ala	Gly	Lys	Ala	Met	Phe	Ser	His	Ser	Tyr	Arg	His	Arg	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ala	Gly	Ala													

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:50:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- 20 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:50:

GGG	GCT	GAT	TGG	ATT	ACT	TTT	CAT	CGT	CGT	CAT	CAT	GAT	CGT	GTT	CTT	48
Gly	Ala	Asp	Trp	Ile	Thr	Phe	His	Arg	Arg	His	His	Asp	Arg	Val	Leu	
1				5					10					15		
TCT	GGG	GCC														57
Ser	Gly	Ala														

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:51:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:51:

Gly Ala Asp Trp Ile Thr Phe His Arg Arg His His Asp Arg Val Leu
 1 5 10 15

Ser Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:52:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:52:

GGG GCT AGT CGT CAT ATG CTT GCT CGG TGG TCG CGT TTG CTT GCT GTT 48
 Gly Ala Ser Arg His Met Leu Ala Arg Trp Ser Arg Leu Leu Ala Val
 1 5 10 15

CCT GGG GCC 57
 Pro Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:53:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:53:

Gly Ala Ser Arg His Met Leu Ala Arg Trp Ser Arg Leu Leu Ala Val
 1 5 10 15

Pro Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:54:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:54:

GGG GCT GGG AAG GCT ATG TTT AGT CAT TCT TAT CGT CAT CGG GGT TCG 48
 Gly Ala Gly Lys Ala Met Phe Ser His Ser Tyr Arg His Arg Gly Ser
 1 5 10 15

GCT GGG GCC 57
 Ala Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:55:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:55:

Gly Ala Gly Lys Ala Met Phe Ser His Ser Tyr Arg His Arg Gly Ser
 1 5 10 15

Ala Gly Ala

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:56:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- 20 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:56:

GGG GCT TGG CAT TGG CGT CAT CGT ATT CCT CTT CAG CTT GCT GCT GGT 48
 Gly Ala Trp His Trp Arg His Arg Ile Pro Leu Gln Leu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

CGT GGG GCC 57
 Arg Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:57:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:57:

Gly Ala Trp His Trp Arg His Arg Ile Pro Leu Gln Leu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Arg Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:58:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla –
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:58:

GGG GCT CGT CGG CAT GGT AAT TTT TCT CAT TTT TTT CAT CGG TCG TTG 48
 Gly Ala Arg Arg His Gly Asn Phe Ser His Phe Phe His Arg Ser Leu
 1 5 10 15

ATT GGG GCC 57
 Ile Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:59:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:59:

Gly Ala Arg Arg His Gly Asn Phe Ser His Phe Phe His Arg Ser Leu
 1 5 10 15

Ile Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:60:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla –
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:60:

GGG GCT TGG AAG GCT TTG TTT AGT CAT TCT TAT CGT CCT CGG GGT TCG	48
Gly Ala Trp Lys Ala Leu Phe Ser His Ser Tyr Arg Pro Arg Gly Ser	
1 5 10 15	
GCT GGG GCC	57
Ala Gly Ala	

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:61:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:61:

Gly Ala Trp Lys Ala Leu Phe Ser His Ser Tyr Arg Pro Arg Gly Ser
1 5 10 15
Ala Gly Ala

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:62:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 57 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- 20 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:62:

GGG GCT CAG GTG GCT GTT TTG TAT CCT CCT TTG GCT GAT GCT ACT GAG	48
Gly Ala Gln Val Ala Val Leu Tyr Pro Pro Leu Ala Asp Ala Thr Glu	
1 5 10 15	
CTT GGG GCC	57
Leu Gly Ala	

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:63:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:63:

Gly Ala Gln Val Ala Val Leu Tyr Pro Pro Leu Ala Asp Ala Thr Glu
 1 5 10 15

Leu Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:64:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla –
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:64:

GGG GCT TGG CGT ATG TAT TTT TCT CAT CGT CAT GCG CAT CTT CGT AGT 48
 Gly Ala Trp Arg Met Tyr Phe Ser His Arg His Ala His Leu Arg Ser
 1 5 10 15

CCT GGG GCC 57
 Pro Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:65:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:65:

Gly Ala Trp Arg Met Tyr Phe Ser His Arg His Ala His Leu Arg Ser
 1 5 10 15

Pro Gly Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:66:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:66:

GGG GCT CAT GCG GAT AGG GTT TAT GGG GCC
 Gly Ala His Ala Asp Arg Val Tyr Gly Ala
 1 5 10

30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:67:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:67:

Gly Ala His Ala Asp Arg Val Tyr Gly Ala
 1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:68:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

15 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:68:

ATTCAGGCC CAGCCGCCA TGGCCGARGT RMAGCKSAK GAGWC 45

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:69:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

25 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:69:

ATTCAGGCC CAGCCGCCA TGGCCGARGT YCARCTKCAR CARYC 45

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:70:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

35 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:70:

ATTCAGGCC CAGCCGCCA TGGCCGAGGT GAAGCKSTS GARTC 45

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:71:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

5 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:71:

10 ATTCAGGCC CAGCCGCCA TGGCCGAVGT GMWGCTKGTG GAGWC 45

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:72:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:72:

20 ATTCAGGCC CAGCCGCCA TGGCCAGGT BCARCTKMAR SARTC 45

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:73:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

25 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:73:

30 GCTGCCACCG CCACCTGMRG AGACDGTGAS TGARG 35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:74:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:74:

40 GCTGCCACCG CCACCTGMRG AGACDGTGAS MGTRG 35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:75:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:75:
5 GCTGCCACCG CCACCTGMRG AGACDGTGAS CAGRG 35
(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:76:
(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 32 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
10 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:76:
15 CCCGGGCCAC CATGGAGACA GACACACTCC TG 32
(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:77:
(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 35 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
20 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:77:
25 CCCGGGCCAC CATGGATTTT CAAGTGCAGA TTTTC 35
(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:78:
(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 32 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
30 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:78:
35 CCCGGGCCAC CATGGAGWCA CAKWCTCAGG TC 32
(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:79:
(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 33 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
40 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:79:
45 CCCGGGCCAC CATGKCCCCW RCTCAGYTTT TKG 33

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:80:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 31 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

5 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:80:

10 CCCGGGCACC ATGAAGTTGC CTGTTAGGCT G 31

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:81:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:81:

20 GCACCTCCAG ATGTAACTG CTC 23

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:82:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 54 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

25 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:82:

30 TAATATCGCG ACAGCTACAG GTGTCCACTC CCGAAGTGAT GCTGGTGGAG WCTG 54

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:83:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:83:

40 TTATAGAATT CTGAGGAGAC GGTGAGTGAG 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:84:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:84:

5 TTAGGCGATA TCGTTCTCTC CCAGTCTCC 29

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:85:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

10 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:85:

15 GTAACCGTTC GAAAAGTGTA CTTACGTTTT ATTTCCAGCA TGGTCC 46

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:86:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 90 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

25 (B) POSICIÓN: 1..90

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:86:

GAA	GTG	ATG	CTG	GTG	GAG	TCT	GGT	GGA	GGA	TTG	GTG	CAG	CCT	AAA	GGG	48
Glu	Val	Met	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Lys	Gly	
1				5					10					15		

TCA	TTG	AAA	CTC	TCA	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AAT			90
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn			
			20					25					30			

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:87:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:87:

Glu	Val	Met	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Lys	Gly
1				5					10					15	

Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn		
			20					25					30		

35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:88:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:88:

AAC TAC GCC ATG AAT TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGA AAG GGT TTG GAA 48
 Asn Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 1 5 10 15

TGG GTT GCT
 Trp Val Ala

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:89:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:89:

Asn Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 1 5 10 15

Trp Val Ala

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:90:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:90:

CGC ATA AGA AGT AAA AGT AAT AAT TAT GCA ACA TTT TAT GCC GAT TCA 48
 Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

GTG AAA GAC 57
 Val Lys Asp

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:91:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:91:

Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Asp

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:92:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 96 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..96

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:92:

AGG TTC ACC ATC TCC AGA GAT GAT TCA CAA AGC ATG CTC TAT CTG CAA 48
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

ATG AAC AAC TTG AAA ACT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TAC TGT GTG AGA 96
 Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg
 20 25 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:93:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:93:

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg
 20 25 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:94:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 69 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

5

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..69

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:94:

CGG	GGG	GCT	TCA	GGG	ATT	GAC	TAT	GCT	ATG	GAC	TAC	TGG	GGT	CAA	GGA	48
Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Asp	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
1				5				10				15				
ACC	TCA	CTC	ACC	GTC	TCC	TCA										69
Thr	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Ser										
				20												

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:95:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:95:

Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Asp	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
1				5				10					15		
Thr	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Ser									
				20											

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:96:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

- (A) LONGITUD: 69 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

25

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..69

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:96:

CAA	ATT	GTT	CTC	TCC	CAG	TCT	CCA	GCA	ATC	CTG	TCT	GCA	TCT	CCA	GGG	48
Gln	Ile	Val	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	
1				5				10				15				
GAA	AAG	GTC	ACA	ATG	ACT	TGC										69
Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys										
				20												

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:97:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

5 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:97:

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
 20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:98:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:98:

AGG GCC AGC TCA AGT GTA AAT TAC ATG CAC
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His
 1 5 10

30

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:99:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

25 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:99:

Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His
 1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:100:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 66 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..66

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:100:

TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AAA CCC TGG ATT TCT GCC 48
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Ser Ala
 1 5 10 15

ACA TCC AAC CTG GCT TCT 66
 Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 20

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:101:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:101:

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Ser Ala
 1 5 10 15

Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:102:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 96 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

20 (ix) PROPIEDAD:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..96

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:102:

GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT 48
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
 1 5 10 15

CTC ACA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC 96
 Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:103:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:103:

```
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
 1           5           10           15
Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
           20           25           30
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:104:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) PROPIEDAD:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..57

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:104:

```
CAG CAG TGG AGT AGT AAC CCA CCC ACG TTC GGA GGG GGG ACC ATG CTG      48
Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Met Leu
 1           5           10           15
```

```
GAA ATA AGA      57
Glu Ile Arg
```

15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:105:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

20

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:105:

```
Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Met Leu
 1           5           10           15
```

```
Glu Ile Arg
```

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un anticuerpo monoclonal, o su fragmento de unión al antígeno, obtenible por la inmunización con la cepa Hay de *S. epidermidis* con N°. de depósito ATCC 55133, que se une específicamente al ácido lipoteicoico (ALT) de bacterias Gram positivas y es de un isotipo de IgG, en el que el anticuerpo se une y aumenta la opsonización de serotipos múltiples de *Staphylococcus epidermidis*, estafilococos coagulasa negativos, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* por células fagocíticas con o sin el complemento comparando con un control apropiado en un ensayo de opsonización *in vitro*, y en el que el anticuerpo es capaz de prevenir la infección estafilocócica en neonatos.
- 10 **2.** El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1 que es un anticuerpo humanizado o su fragmento de unión al antígeno, que comprende una cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la secuencia 96-110 de la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina expuesta en SEQ ID NOs 98 100 y 104 y una cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 96-110 expuesta en SEQ ID NO 88, 90 y 94.
- 15 **3.** El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1, que comprende la región variable de la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO 86 a 95 y la región variable de la cadena ligera expuesta en SEQ ID NO 96 a 105.
- 20 **4.** El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1, que comprende una región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO 96 a 105, a condición de que el aminoácido 1 de la cadena ligera sea el ácido aspártico y el aminoácido 106 de la cadena ligera sea lisina.
- 25 **5.** El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico que comprende las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina 96-110 expuestas en SEQ ID NO 86 a 105 y una región constante humana.
- 30 **6.** El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo anti-ALT, comprendiendo la cadena ligera:
 - (i) las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones variables de la secuencia 96-110 de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina expuesta en SEQ ID NO 98, 100 y 104
 - (ii) las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones variables de la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 96-110 expuesta en SEQ ID NO 88, 90 y 94; y
 - (iii) una región marco variable de una cadena pesada humana aceptadora de inmunoglobulina.
- 7.** El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es del isotipo de IgG1.
- 35 **8.** El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un anticuerpo quimérico o su fragmento de unión al antígeno en el que el anticuerpo comprende una región Fc humana.
- 9.** El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂ o sFv de un anticuerpo.
- 40 **10.** El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo se une al serotipo 5, serotipo 8 o tanto al serotipo 5 como al serotipo 8 de *Staphylococcus aureus*.
- 45 **11.** El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo además se une específicamente a ALT de una o varias bacterias Gram positivas seleccionadas del grupo que consiste en *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus pyogenes*.
- 12.** El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo reduce la inflamación mediada por ALT, la producción de citoquina mediada por ALT o la combinación de estos.
- 50 **13.** El anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo bloquea la unión de bacterias Gram positivas a células epiteliales humanas.
- 14.** Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de las reivindicaciones 1-6 y un vehículo farmacéutico.
- 15.** La composición farmacéutica de la reivindicación 14, que comprende además al menos un anticuerpo adicional.
- 16.** El anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo es formulado para su uso como un medicamento.
- 55 **17.** El anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1-6 para su uso en la prevención de una infección estafilocócica en neonatos.

18. El uso de una dosis eficaz del anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1-6 en la fabricación de un medicamento para la prevención de una infección estafilocócica en neonatos.

19. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, de las reivindicaciones 1-6.

5 **20.** Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 19.

21. Una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 19 o el vector de la reivindicación 20.

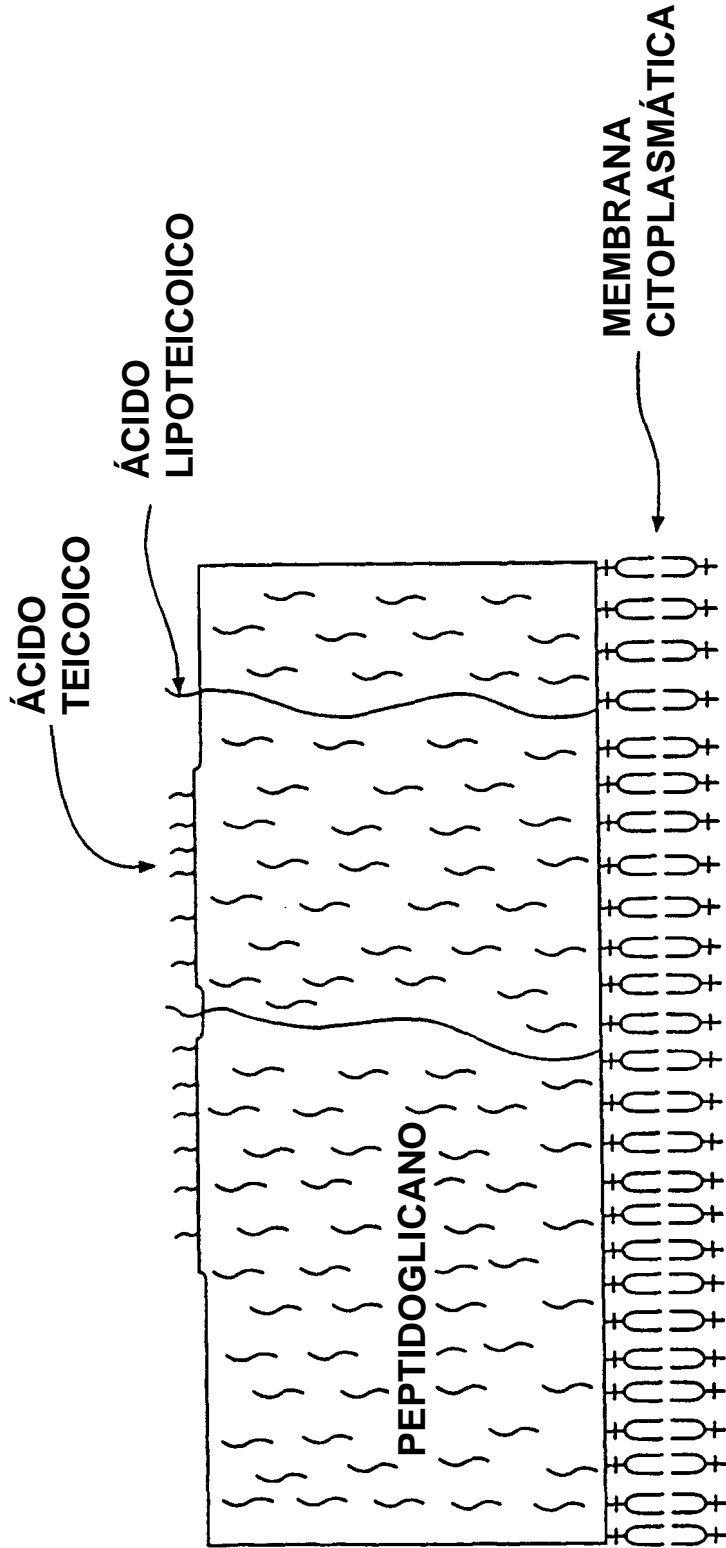


FIG. 1

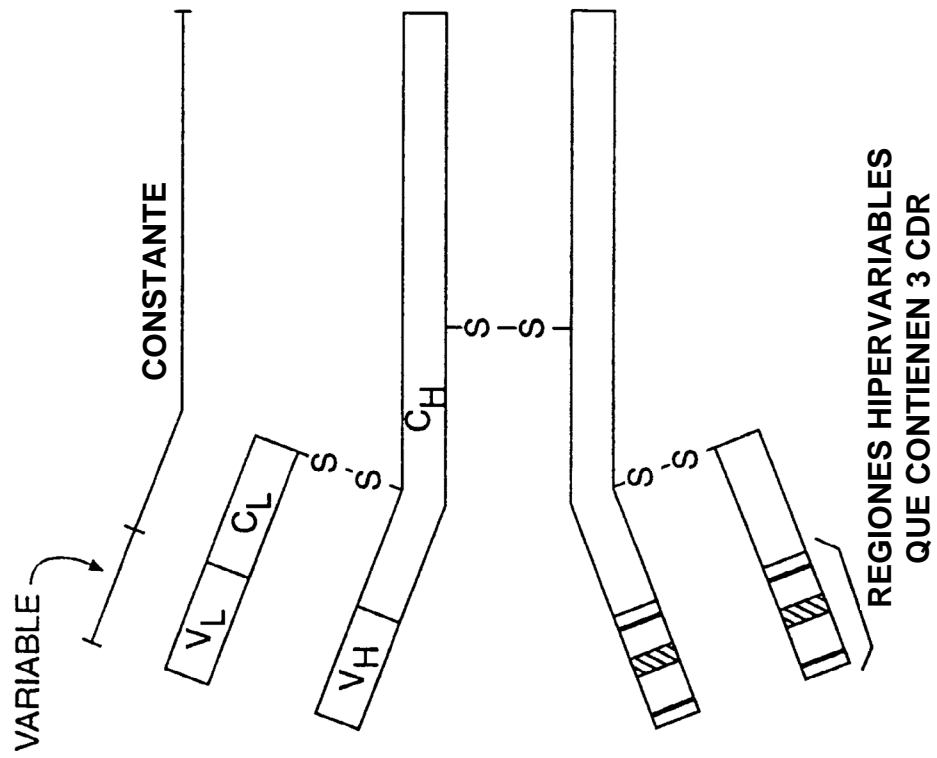
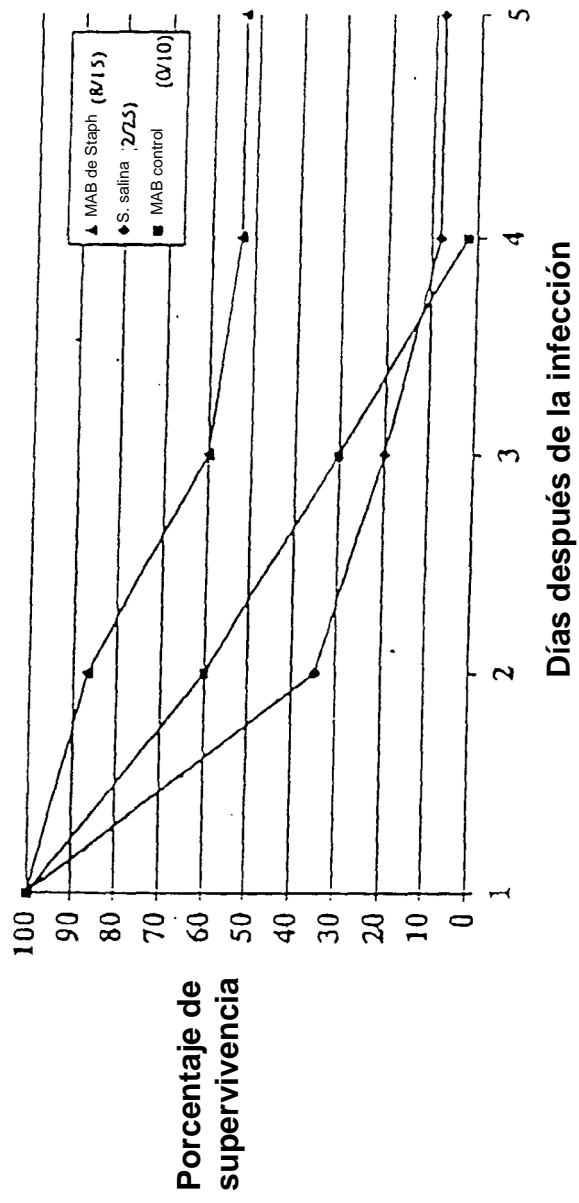


FIG. 2

FIGURA 3

Efecto del MAB 96-110 anti-Staph sobre la supervivencia en un modelo de sépsis de *S. aureus* letal



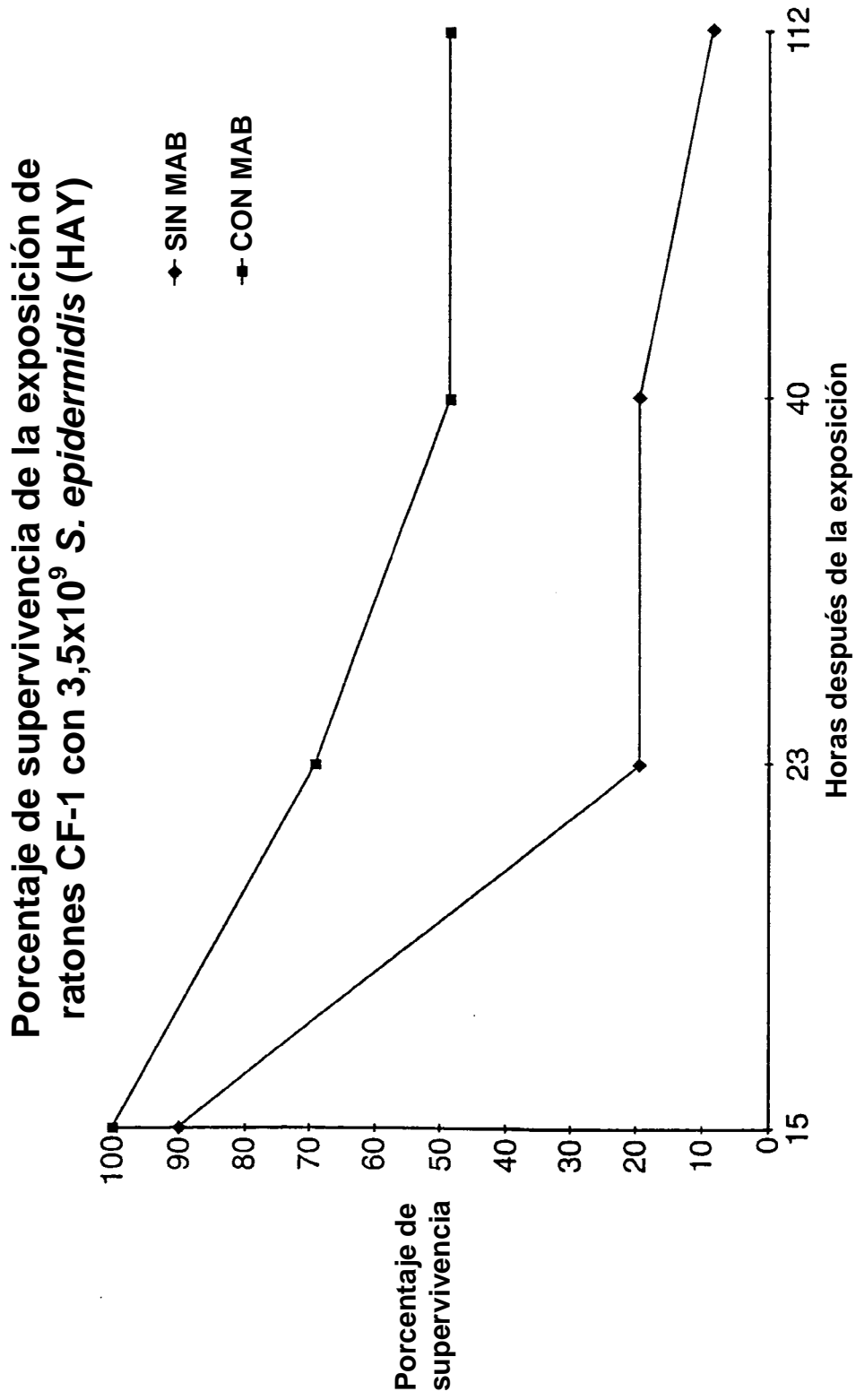


FIG. 4

6MER. SEQ

	10	20	30	
41:13.6mer2-1	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	SEQ ID NO.4
61	C A H	A D R V	Y G A	SEQ ID NO.5
42:14.6mer2-2	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	
65	G A H	A D R V	Y G A	
43:15.6mer2-3	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	
66	G A H	A D R V	Y G A	
44:16.6mer2-4	GGGA-TCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	SEQ ID NO.6
62	G ? H	A D R V	Y G A	SEQ ID NO.7
45:17.6mer2-5	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	
67	G A H	A D R V	Y G A	
46:18.6mer2-6	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	
68	G A H	A D R V	Y G A	
47:19.6mer2-7	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	
69	G A H	A D R V	Y G A	
48:20.6mer2-8	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	
70	G A H	A D R V	Y G A	
49:21.6mer2-9	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	
71	G A H	A D R V	Y G A	
51:23.6mer2-11	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	
72	G A H	A D R V	Y G A	
52:24.6mer2-12	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	
73	G A H	A D R V	Y G A	
53:25.6mer2-13	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	
74	G A H	A D R V	Y G A	
54:26.6mer2-14	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	
75	G A H	A D R V	Y G A	
55:27.6mer2-15	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	
76	G A H	A D R V	Y G A	
56:28.6mer2-16	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	
77	G A H	A D R V	Y G A	
58:30.6mer2-18	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	
78	G A H	A D R V	Y G A	
59:31.6mer2-19	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	
79	G A H	A D R V	Y G A	
60:32.6mer2-20	GGGGCTCATG	CGGATAGGGT	TTATGGGGCC	
80	G A H	A D R V	Y G A	

FIG. 5

15MER2 . SEQ		10	20	30	40	50	60
50:07.15mer2-1/0	GGGGCTTGGC	ATTGGCGTCA	TCGTATTCCCT	CTTCAGCTTG	CTGCTGGTGC	TGGGGCC	SEQ ID NO.8
70	G A (W)	H W R H	R I P	L Q L	A A G R	G A	SEQ ID NO.9
52:09.15mer2-3/0	GGGGCTCGTC	GGGATGGTAA	TTTTTCTCAT	TTTTTTCATC	GGTCGTTTCA	TGGGGCC	SEQ ID NO.10
72	G A R	(R) (H) G N	(F) (S) (H)	F F (H)	(R) S L I	G A	SEQ ID NO.11
53:10.15mer2-4/0	GGGGCTTCCA	AGGCTTTGTT	TAGTCATTCT	TATCGTCCCTC	GGGGTTCCGC	TGGGGCC	SEQ ID NO.12
73	G A (W)	(K) A L (F)	(S) (H) S	Y (R) P	R G S A	G A	SEQ ID NO.13
54:11.15mer2-5/0	GGGGCTTGGC	ATTGGCGTCA	TCGTATTCCCT	CTTCAGCTTG	CTGCTGGTGC	TGGGGCC	SEQ ID NO.14
74	G A R	H W R H	R I P	L Q L	A A G R	G A	SEQ ID NO.15
56:13.15mer2-7/0	GGGGCTTGGC	ATTGGCGTCA	TCGTATTCCCT	CTTCAGCTTG	CTGCTGGTGC	TGGGGCC	SEQ ID NO.16
76	G A W	H W R H	R I P	L Q L	A A G R	G A	SEQ ID NO.17
57:14.15mer2-8/0	GGGGCTTGGC	ATTGGCGTCA	TCGTATTCCCT	CTTCAGCTTG	CTGCTGGTGC	TGGGGCC	SEQ ID NO.18
77	G A W	H W R H	R I P	L Q L	A A G R	G A	SEQ ID NO.19
58:15.15mer2-9/0	GGGGCTCAGG	TGGCTGTTTT	CTATCCTCCT	TTGGCTGATG	CTACTGAGCT	TGGGGCC	SEQ ID NO.20
78	G A Q	V A V L	Y P P	L A D	A T E L	G A	SEQ ID NO.21
59:16.15mer2-10/0	GGGGCTCGTC	GGGATGGTAA	TTTTTCTCAT	TTTTTTCATC	GGTCGTTTCA	TGGGGCC	SEQ ID NO.22
79	G A R	R H G N	F S H	F F H	R S L I	G A	SEQ ID NO.23
60:17.15mer2-11/0	GGGGCTCGTC	GGGATGGTAA	TTTTTCTCAT	TTTTTTCATC	GGTCGTTTCA	TGGGGCC	SEQ ID NO.24
80	G A R	R H G N	F S H	F F H	R S L I	G A	SEQ ID NO.25
61:18.15mer2-12/0	GGGGCTTGGC	GTATGTATTT	TTCTCATCGT	CATGGCCTATC	TTCCGTAGTCC	TGGGGCC	SEQ ID NO.26
81	G A (W)	R M Y (F)	(S) (H) R	H A (H)	(L) R S P	G A	SEQ ID NO.27
62:19.15mer2-13/0	GGGGCTTGGC	GTATGTATTT	TTCTCATCGT	CATGGCCTATC	TTCCGTAGTCC	TGGGGCC	SEQ ID NO.28
82	G A W	R M Y F	S H R	H A H	L R S P	G A	SEQ ID NO.29
63:20.15mer2-14/0	GGGGCTTGGC	GGAAGTATTT	TTCTTATCAT	CATGGCCTATC	TTTGTAGTCC	TGGGGCC	SEQ ID NO.30
83	G A W	R M Y F	S Y H	H A H	L C S P	G A	SEQ ID NO.31
64:21.15mer2-15/0	GGGGCTTGGC	GTATGTATTT	TTCTCATCGT	CATGGCCTATC	TTCCGTAGTCC	TGGGGCC	SEQ ID NO.32
84	G A W	R M Y F	S H R	H A H	L R S P	G A	SEQ ID NO.33
65:22.15mer2-16/0	GGGGCTTGGC	GTATGTATTT	TTCTCATCGT	CATGGCCTATC	TTCCGTAGTCC	TGGGGCC	SEQ ID NO.34
85	G A W	R M Y F	S H R	H A H	L R S P	G A	SEQ ID NO.35

FIG. 6A

15MER2..SEQ		10	20	30	40	50	60	
66:23.15mer2-17/0	GGGGCTTGGC	GTATGTATTT	TTCTCATCGT	CATGGGCATC	TTCGTAGTCC	TGGGGCC	SEQ	ID NO.36
86	G A W	R M Y F	S H R	H A H	L R S P	G A	SEQ	ID NO.37
67:24.15mer2-18/0	GGGGCTCGTC	GGCATGGTAA	TTTTTCTCAT	TTTTTTCATC	GGTCGTTGAT	TGGGGCC	SEQ	ID NO.38
87	G A H	R H G N	F S H	F F H	R S L I	G A	SEQ	ID NO.39
68:25.15mer2-19/0	GGGGCTTGGC	ATTGGCGTCA	TCGTATTCCT	CTTCAGCTTG	CTGCTGGTCG	TGGGGCC	SEQ	ID NO.40
88	C A W	H W R H	R I P	L Q L	A A G R	G A	SEQ	ID NO.41
69:26.15mer2-20/0	GGGGCTCGTC	GGCATGGTAA	TTTTTCTCAT	TTTTTTCATC	GGTCGTTGAT	TGGGGCC	SEQ	ID NO.42
89	G A H	R H G N	F S H	F F H	R S L I	G A	SEQ	ID NO.43

FIG. 6B

15MER1.SEQ

	10	20	30	40	50	60	
51:28.15mer1-2/0	GGGGCTGATT	CGATTACTTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTC	TGGGGCC	SEQ ID NO.44
67	G A D	W I T (F)	H R R	H (H) D	(R) V L S	G A	SEQ ID NO.45
52:29.15mer1-3/0	GGGGCTGGTT	CGATTACTTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTC	TGGGGCC	SEQ ID NO.46
68	G A D	W I T F	H R R	H H D	R V L S	G A	SEQ ID NO.47
53:32.15mer1-6/0	GGGGCTGGTT	CGATTACTTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTC	TGGGGCC	
65	G A D	W I T F	H R R	H H D	R V L S	G A	
62:13.15mer1-7/0	GGGGCTGGTT	CGATTACTTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTC	TGGGGCC	
66	G A D	W I T F	H R R	H H D	R V L S	G A	
63:14.15mer1-8/0	GGGGCTGGTT	CGATTACTTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTC	TGGGGCC	
67	G A D	W I T F	H R R	H H D	R V L S	G A	
64:15.15mer1-9/0	GGGGCTGGTT	CGATTACTTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTC	TGGGGCC	
68	G A D	W I T F	H R R	H H D	R V L S	G A	
65:16.15mer1-10/0	GGGGCTGGTT	CGATTACTTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTC	TGGGGCC	
69	G A D	W I T F	H R R	H H D	R V L S	G A	
56:17.15mer1-11/0	GGGGCTGGTT	CGATTACTTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTC	TGGGGCC	
70	G A D	W I T F	H R R	H H D	R V L S	G A	
57:28.15mer1-12/0	GGGGCTGGTT	CGATTACTTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTC	TGGGGCC	
71	G A D	W I T F	H R R	H H D	R V L S	G A	
58:29.15mer1-13/0	GGGGCTGGTT	CGATTACTTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTC	TGGGGCC	
72	G A D	W I T F	H R R	H H D	R V L S	G A	
59:20.15mer1-14/0	GGGGCTGGTT	CGATTACTTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTC	TGGGGCC	
73	G A D	W I T F	H R R	H H D	R V L S	G A	
70:21.15mer1-15/0	GGGGCTGGTT	CGATTACTTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTC	TGGGGCC	
74	G A D	W I T F	H R R	H H D	R V L S	G A	
71:22.15mer1-16/0	GGGGCTGGGA	AGGCTATGTT	TAGTCATTC	TATCGTCATC	GGGGTCCGC	TGGGGCC	SEQ ID NO.48
75	G A D	(K) A M (F)	(S) (H) S Y R	(H) (R) G S A	(R) G S A	G A	SEQ ID NO.49
72:23.15mer1-17/0	GGGGCTGGTT	CGATTACTTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTC	TGGGGCC	
76	G A D	W I T F	H R R	H H D	R V L S	G A	

FIG. 7A

15MER1 . SEQ

	10	20	30	40	50	60
73:24.15mer1-18/0	GGGGCTGGTT	CGATTACTTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTC	TGGGGCC
77	G A D W I T F	H R R H H D	R R R H H D	R V L S G A		
74:25.15mer1-19/0	GGGGCTGGTT	CGATTACTTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTC	TGGGGCC
78	G A D W I T F	H R R H H D	R R R H H D	R V L S G A		
75:26.15mer1-20/0	GGGGCTGGTT	CGATTACTTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTC	TGGGGCC
79	G A D W I T F	H R R H H D	R R R H H D	R V L S G A		

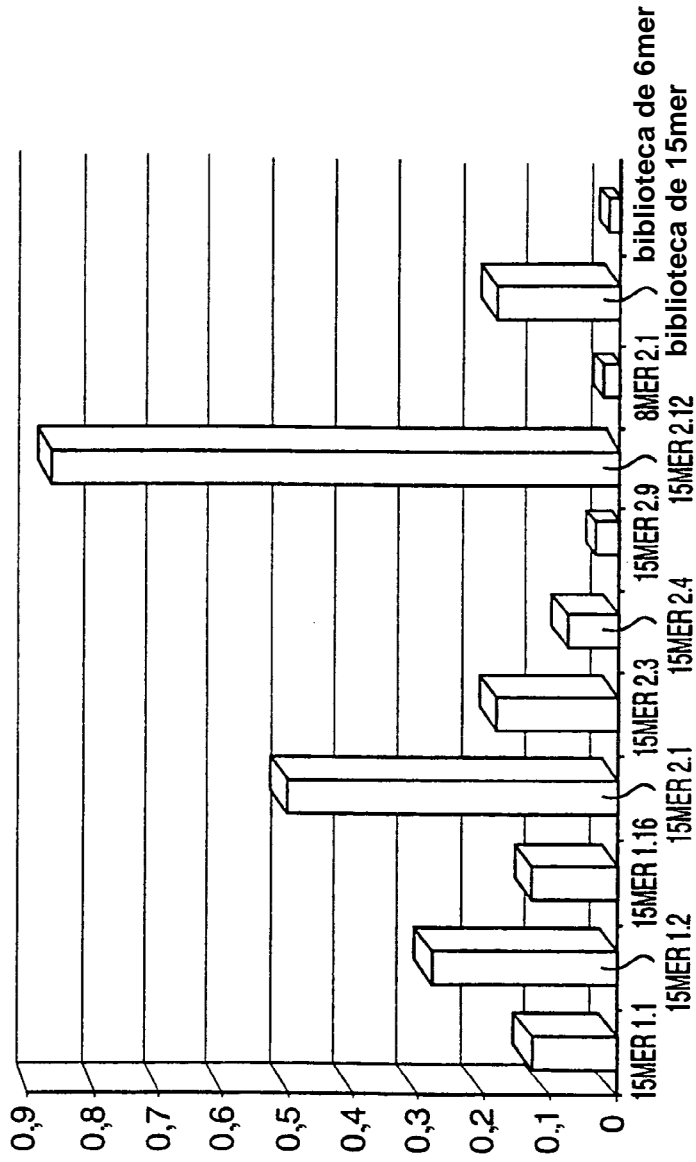
FIG. 7B

Lista maestra

	10	20	30	40	50	60	70
51:15mer 1st.1	GGGGCTGATT	CGATTACATTT	TCATCGTCGT	CATCATGATC	GTGTTCTTTTC	TGGGGCC	16/17 SEQ ID NO.50
57	G A D W I T F H R R	H H D R V L S G A					SEQ ID NO.51
90 15mer 1st.2	GGGGCTAGTC	GTCATATGCT	TGCTCGGTGG	TCCGGTTTGC	TTGCTGTTTC	TGGGGCC	1/10 SEQ ID NO.52
91	G A S R H M L A R W	S R L L A V P G A					SEQ ID NO.53
71:15mer 1st.16	GGGGCTGGGA	AGGCTATGTT	TAGTCATTTCT	TATCGTCAATC	GGCGTTCGGC	TGGGGCC	1/17 SEQ ID NO.54
85	G A G K A M F S H S	Y R H R G S A G A					SEQ ID NO.55
92 15mer 2nd.1	GGGGCTTGGC	ATTGGCGTCA	TCGTATTCCT	CTTCAGCTTG	CTGCTGGTGC	TGGGGCC	5/18 SEQ ID NO.56
98	G A W H W R H R I P	L Q L A A G R G A					SEQ ID NO.57
93 15mer 2nd.3	GGGGCTCGTC	GGCATGGTAA	TTTTTCTCAT	TTTTTTTCAATC	GGTTCGTTGAT	TGGGGCC	6/18 SEQ ID NO.58
99	G A R R H G N F S H	F F H R S L I G A					SEQ ID NO.59
94 15mer 2nd.4	GGGGCTTGGG	AGGCTTTGTT	TAGTCATTTCT	TATCGTCTCCTC	GGGGTTCGGC	TGGGGCC	1/18 SEQ ID NO.60
100	G A W X A L F S H S	Y R P R G S A G A					SEQ ID NO.61
95 15mer 2nd.9	GGGGCTCAGG	TGGCTGTTTT	GTATCCTCCT	TTGGCTGATG	CTACTGAGCT	TGGGGCC	1/18 SEQ ID NO.62
101	G A Q V A V L Y P P	L A D A T E L G A					SEQ ID NO.63
96 15mer 2nd.12	GGGGCTTGGC	GTATGTAATTT	TTCTCATCGT	CATGGCCATC	TTCCGTAGTCC	TGGGGCC	6/18 SEQ ID NO.64
102	G A W R M Y F S H R	H A H L R S P G A					SEQ ID NO.65
97 6mer 2nd.1	GGGGCTCATG	CGGATAGGCT	TTATGGGGCC				18/18 SEQ ID NO.66
103	G A H A D R V Y G A						SEQ ID NO.67

FIG. 8

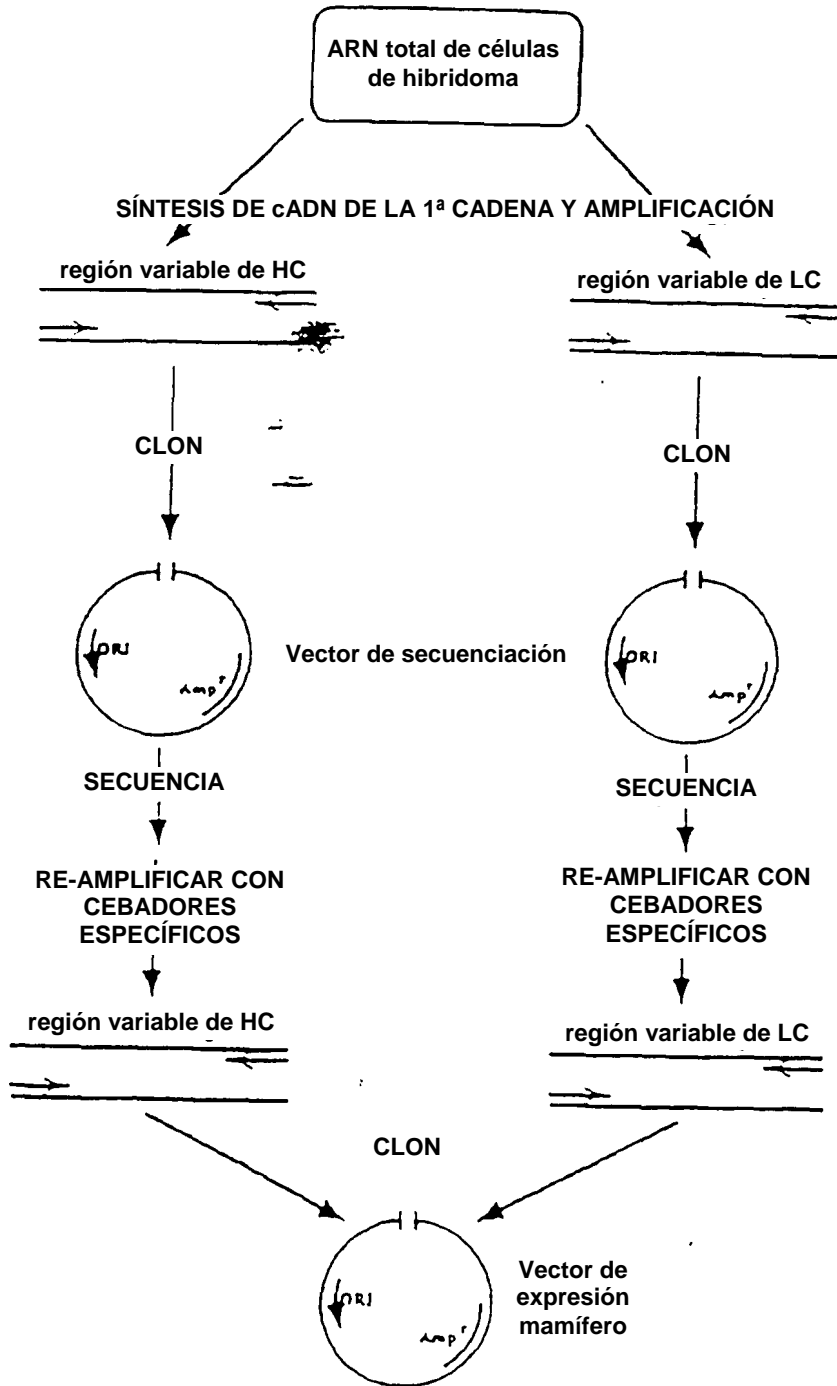
COMPARACIÓN DE SEÑALES A $6,25 \times 10^{11}$ virus/ml



3ª RONDA DE AISLADOS

FIG. 9

FIGURA 10: ESTRATEGIA DE CLONACIÓN GENERAL



CEBADORES "DIRECTOS" DE LA CADENA PESADA DE RATÓN

JSS1

5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGARGTRMAGCTKSAKAGWC-3' SEQ ID NO.68 -

JSS2

5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGARGTYCARCTKARCARYC-3' SEQ ID NO.69

JSS3

5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGTGAAGCTKSTSGARTC-3' SEQ ID NO.70

JSS4

5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAVGTGMWGCTKGTGGAGWC-3' SEQ ID NO.71

JSS8

5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTBCARCTKMARSARTC-3' SEQ ID NO.72

CEBADORES "INVERSOS" DE LA CADENA PESADA DE RATÓN

JS160

5'-GCTGCCACCGCCACCTGMRGAGACDGTGASTGARG-3' SEQ ID NO.73

JS161

5'-GCTGCCACCGCCACCTGMRGAGACDGTGASMGTRG-3' SEQ ID NO.74

JS162

5'-GCTGCCACCGCCACCTGMRGAGACDGTGASCARG-3' SEQ ID NO.75

CEBADORES "DIRECTOS" DE LA SECUENCIA LÍDER DE LA CADENA LIGERA DE RATÓN

PMC12

5'-CCCGGCCACCATGGAGACAGACACTCCTG-3' SEQ ID NO.76

PMC13

5'-CCCGGCCACCATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTC-3' SEQ ID NO.77

PMC14

5'-CCCGGCCACCATGGAGWCACAKWCTCAGGTC-3' SEQ ID NO.78

PMC15

5'-CCCGGCCACCATGKCCCWRCTCAGYTTCTKG-3' SEQ ID NO.79

PMC55

5'-CCCGGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTG-3' SEQ ID NO.80

CEBADOR "INVERSO" DE LA CADENA LIGERA DE RATÓN

OKA57

5'-GCACCTCCAGATGTTAACTGCTC-3' SEQ ID NO.80

"96-110" CEBADORES ESPECÍFICOS

96110HF2

5'-TAATATCGCGACAGCTACAGGTGTCCACTCCCGAAGTGATGCTGGTGAGWCTG-3' SEQ ID NO.82

96110HB

5'-TTATAGAATTCTGAGGAGACGGTGAGTGAG-3' SEQ ID NO.83

96110BLF

5'-TTAGGCGATAGCGTTCTCTCCCAGTCTCC-3' SEQ ID NO.84

96110BLB

5'-GTAACCGTTCGAAAAGTGTACTTACGTTTTATTTCAGCATGGTCC-3' SEQ ID NO.85

FIG. 11

REGIÓN VARIABLE DE LA CADENA PESADA DE 96-110 ANTI-STAPH (HAY) (TIPO IIIA)

GAAGTGAATCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGATTTGGTGCAGCTTAAAGGTCATTTGAAACTCTCATFTGCAGCCCTGGATTACACCTTCAAT SEQ ID NO.86
 E V M L V E S G G L V Q P ~~X~~ G S L ~~X~~ L S C A A S G F T F N SEQ ID NO.87

AACTACGCCAATGAAT TGGGTCGCCAGGCTCCAGGAAGGTTTGGAAATGGGTTGCT SEQ ID NO.88
 N Y A M N W V R Q A P G ~~X~~ G L E W V A SEQ ID NO.89

CGCATAAGTAAGTAATAATTTGCAACATTTTATGCCGATTCAGTGAAGAC SEQ ID NO.90
 R I R S K S N N Y A T F Y A D S V ~~X~~ D SEQ ID NO.91

AGGTTCCCACTCCAGAGATGATTCACAAGCATGCTCTATCTGCAATGCAACAACCTGAAACTGAAACACAGCCATGATTACTGTGTGAGA SEQ ID NO.92
 R P T I S R D D S Q S M L Y L Q M N N L ~~X~~ T E D T A M Y Y C V R SEQ ID NO.93

CGGGGGCTCAGGGATGACTATGCTATGGACTAC TGGGGTCAAGGAACCTCACCTCACCGTCTCCTCA SEQ ID NO.94
 R G A S G I D Y A M D Y W G Q G T S L T V S S SEQ ID NO.95

REGIÓN VARIABLE DE LA CADENA LIGERA DE 96-110 ANTI-STAPH (HAY) (TIPO VI)

CAAATGTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTGTCATCTCCAGGGGAAAGGTCACAATGACTGC SEQ ID NO.96
 Q I V L S Q S P A I L S A S P G E K V T H T C SEQ ID NO.97

AGGGCCAGTCAAGTGAATTAATGACAC SEQ ID NO.98
 R A S S S V N Y M ~~X~~ SEQ ID NO.99

TGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCTCCCCCAAAACCTGGATTTCT GCCACATCCAACCTGGCTTCT SEQ ID NO.100
 W Y Q Q K P G S S P K P N I S A T S N L A S SEQ ID NO.101

GGAGTCCCTGCTCGCTCAGTGGCAGTGGGTCITGGACCTCTTACTCTTCACAATCACAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAATCTGC SEQ ID NO.102
 G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S R V E A E D A A T Y Y C SEQ ID NO.103

CAGCAGTGAAGTAGTAAACCCACCAGG TTCGGAGGGGGGACCATGCTGGAATAAGA SEQ ID NO.104
 Q Q W S S N P P T F G G G T M L E I R SEQ ID NO.105

Regiones CDR subrayadas

FIG. 12

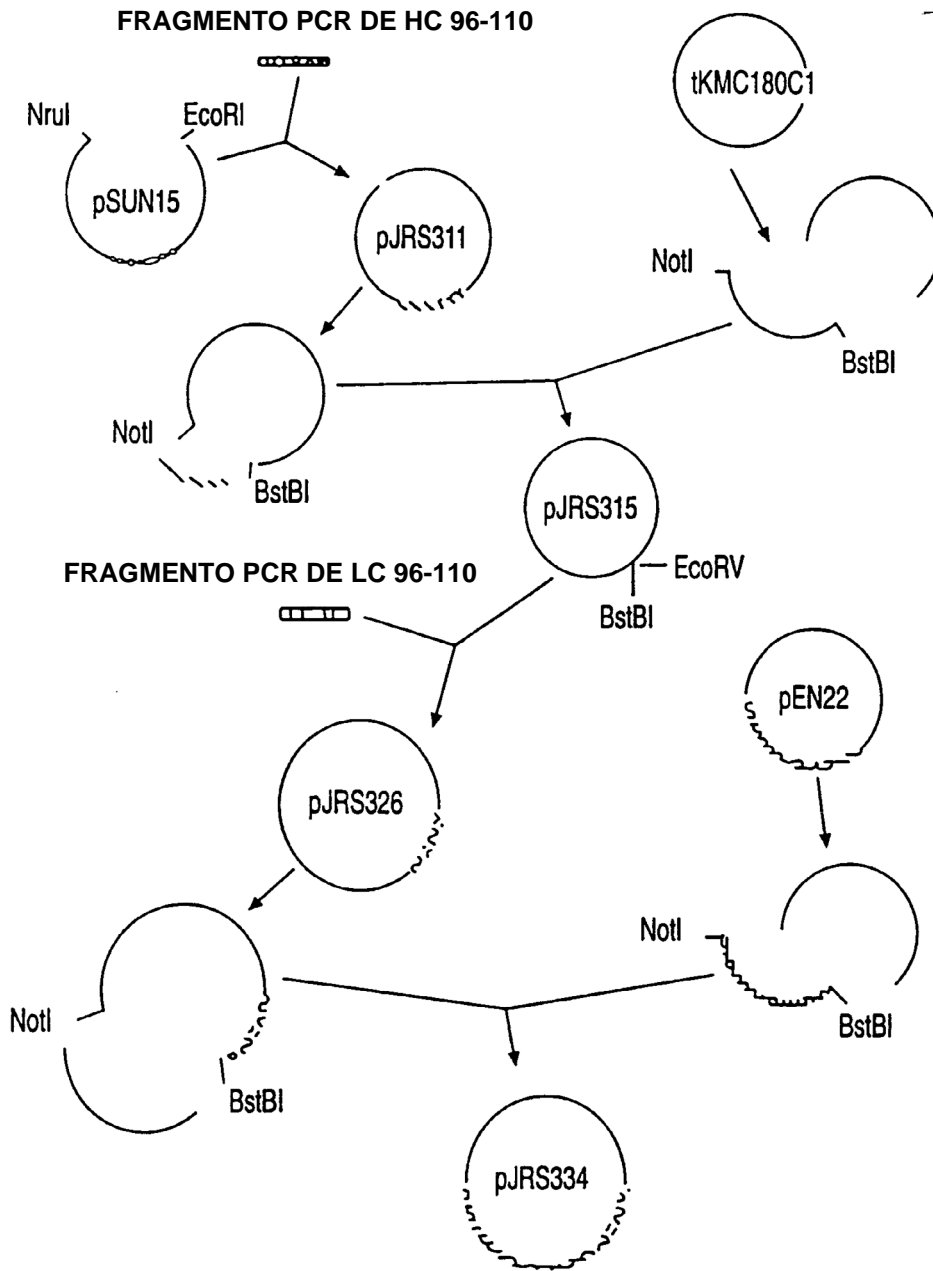
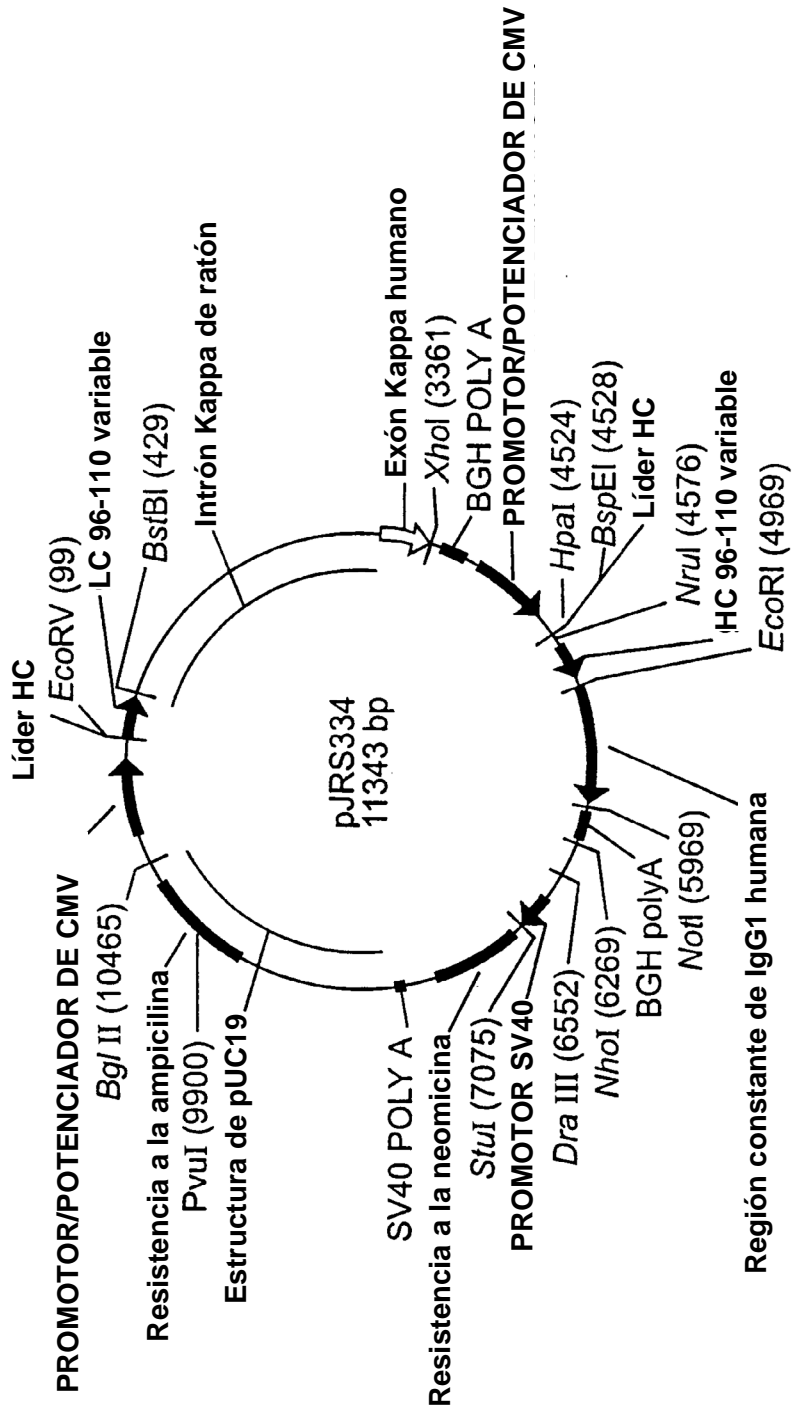


FIG. 13



Sitios de restricción únicos comunes mostrados

FIG. 14

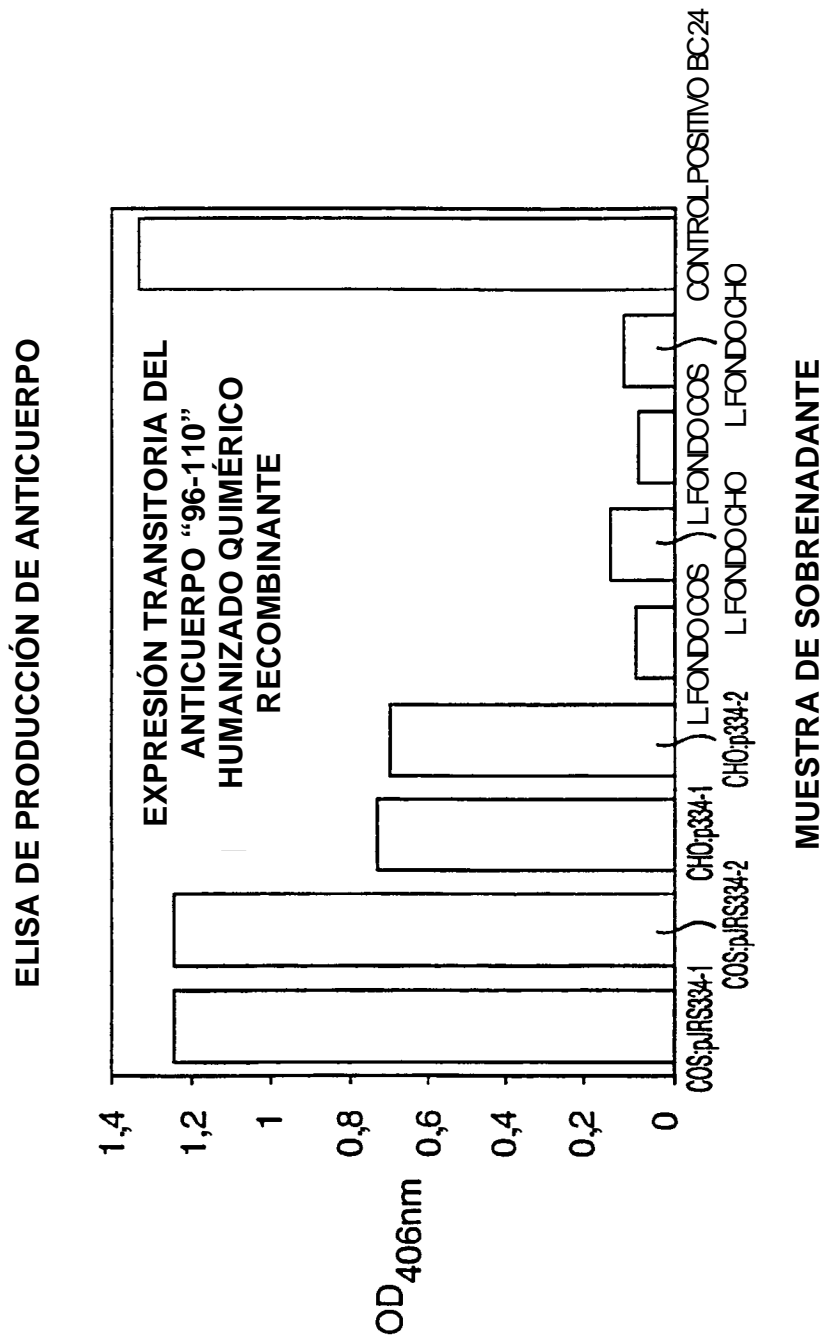
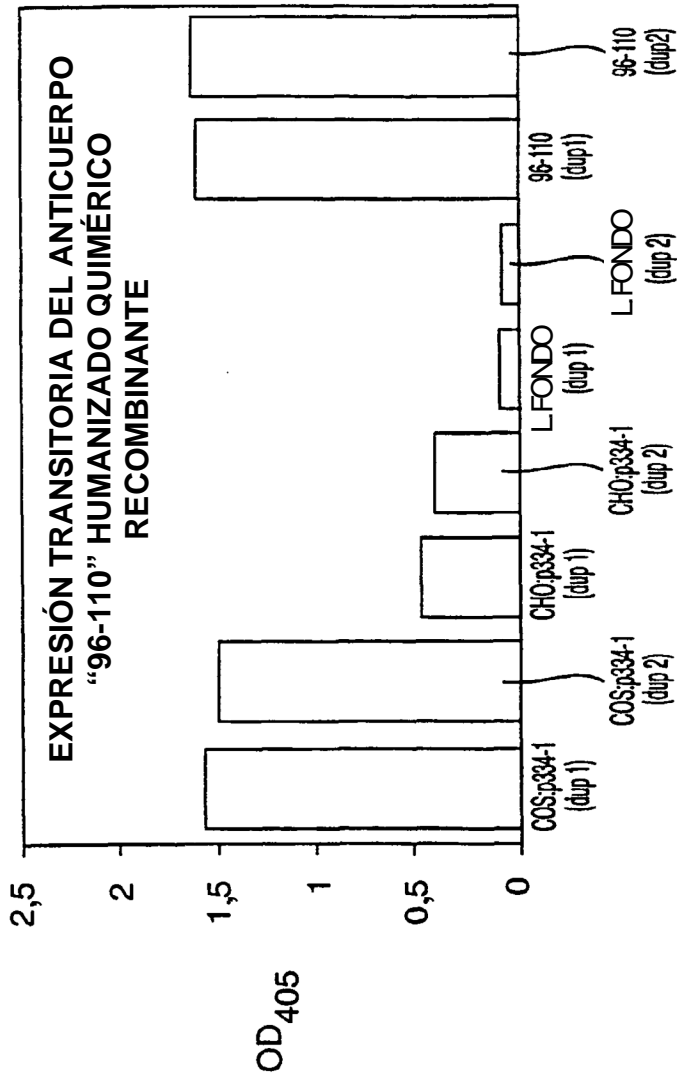


FIG. 15

ELISA DE ACTIVIDAD DE HAY ANTI-STAPH

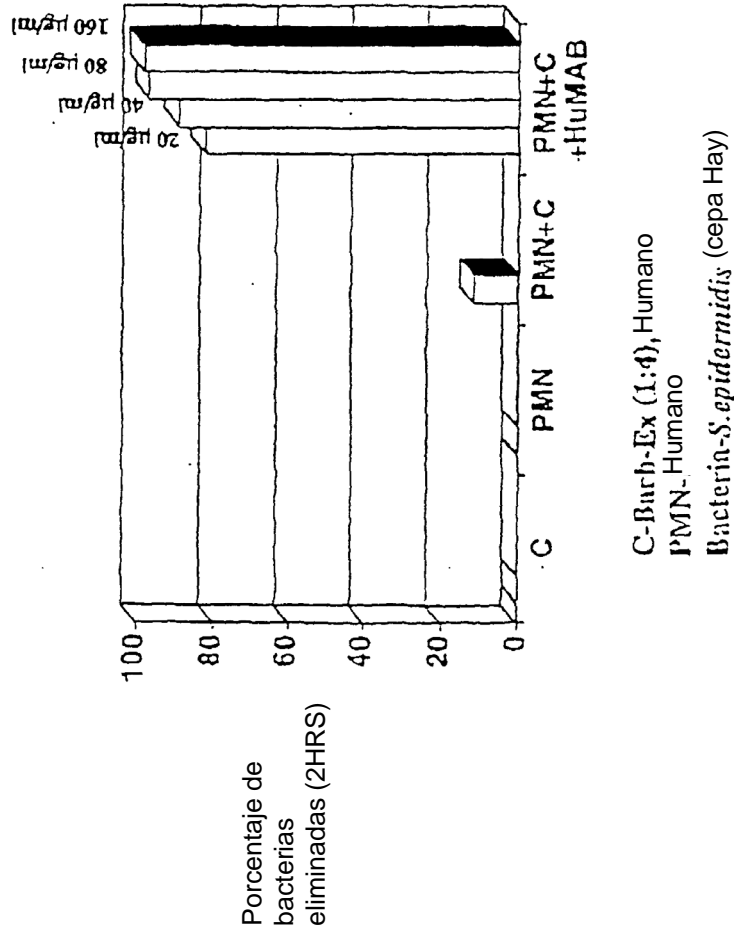


MUESTRA DE SOBRENADANTE

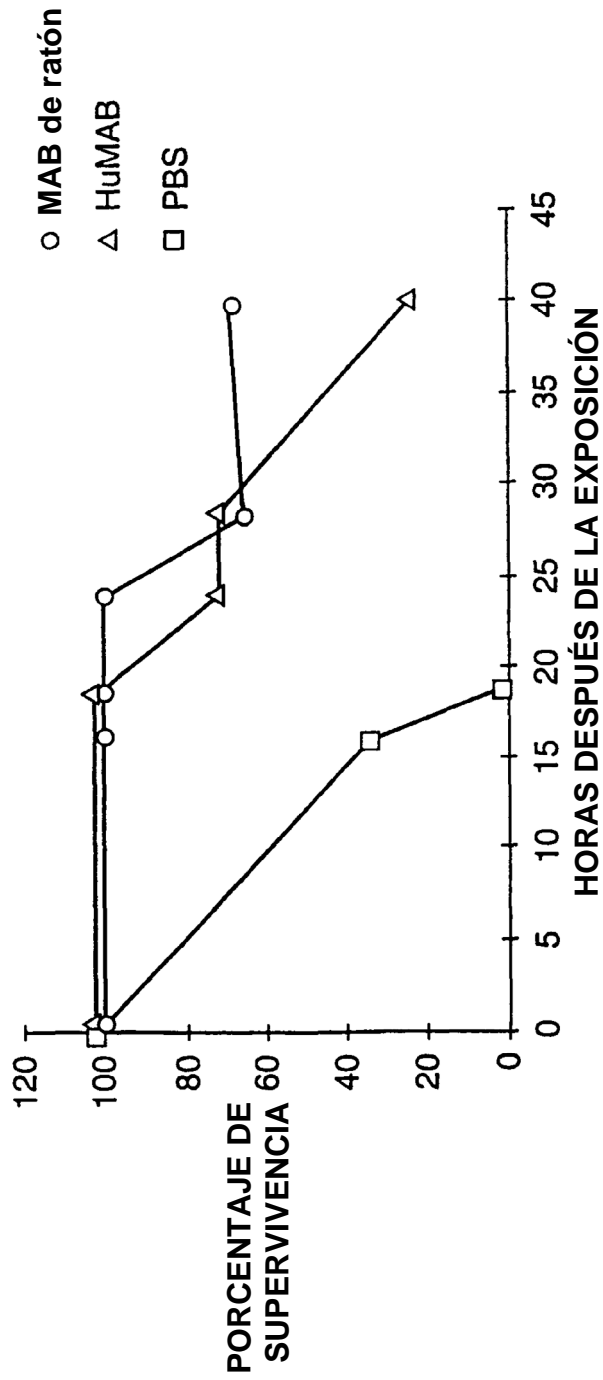
FIG. 16

FIGURA 17

Actividad opsonica de HuMAB 96-110 para *S. epidermidis* en un ensayo bactericida opsonofagocitico mediado por neutrófilos usando complemento humano



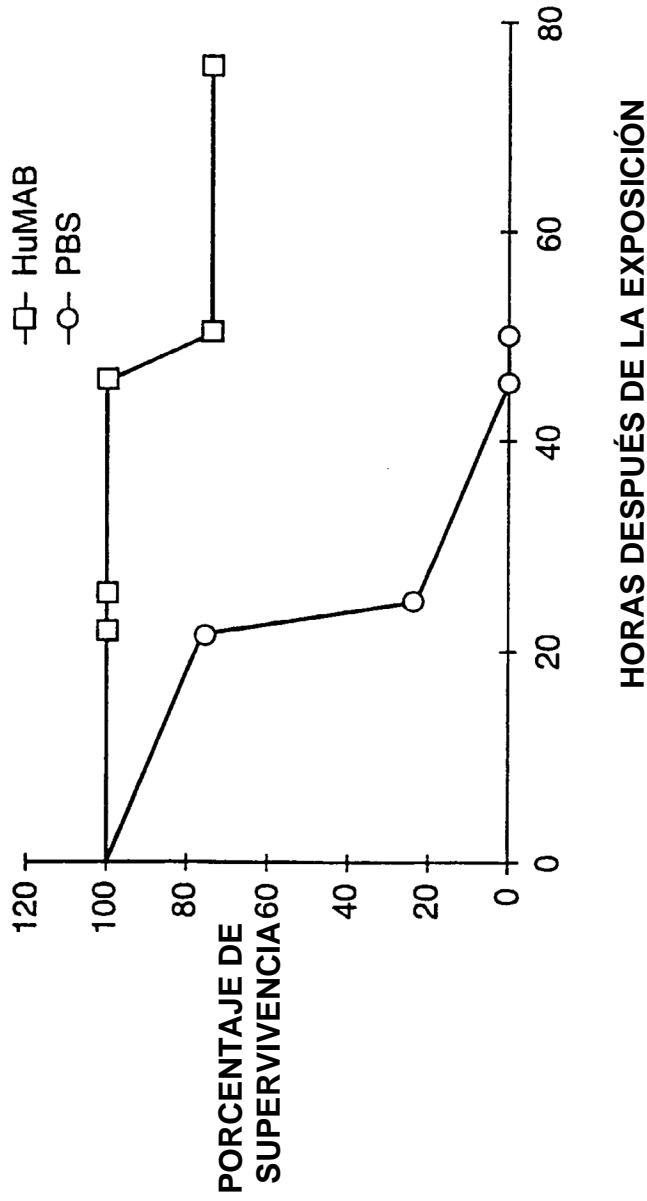
Estudio piloto para comparar el efecto del MAB 96-110 y el HuMAB en un modelo letal de sépsis de *S. Epidermidis*



Dosis de MAB: 14 mg/kg dado IP, 24 y 1 hora antes de la infección

FIG. 18

Supervivencia de ratón CF-1 después de la
exposición intraperitoneal con 3×10^9 de *S.*
Epidermidis (HAY)



18 mg/kg/dosis, IP, 24 y 1 hora antes de la infección

FIG. 19

Efecto de HuMAB 96-110 sobre la bacteremia en un modelo de sépsis de *S. Epidermidis* letal

Media geométrica del nivel de bacteremia

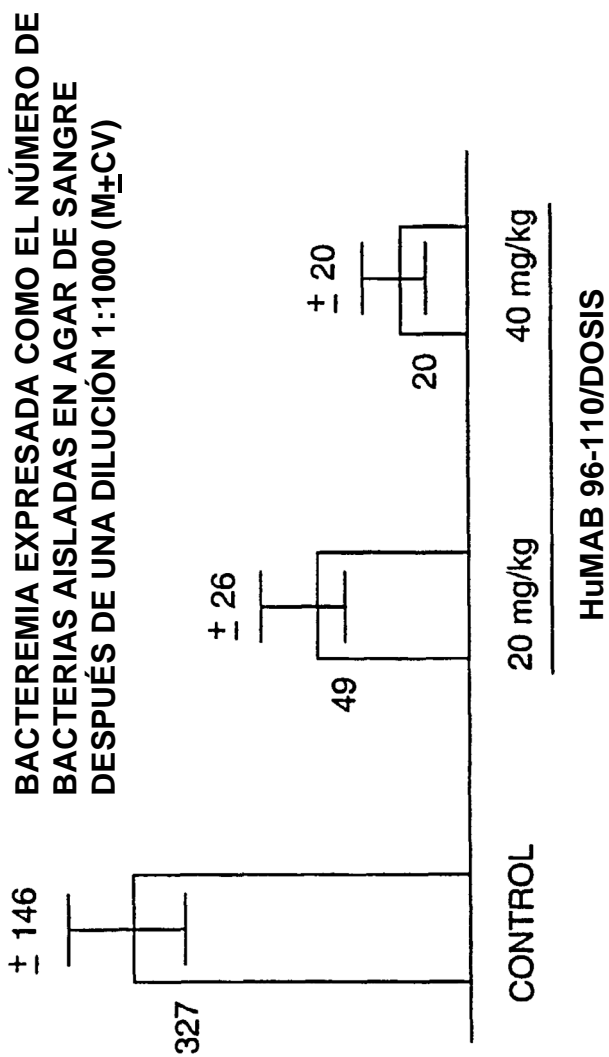
Solución salina					
Placebo	6,5 x 10 ⁴	7,2 x 10 ⁴	5,2 x 10 ⁴	7 x 10 ³	
HuMAB 96-110	3 x 10 ²	7,5 x 10 ²	2,1 x 10 ¹	1,7 x 10 ¹	
	4 hrs	8 hrs	12 hrs	18 hrs	

TIEMPO DESPUÉS DE LA INFECCIÓN

18 mg/kg/dosis de HuMAB 96-110 o solución salina dada IP, 24 y 1 hora antes de la infección IP con 3x10⁹ *S. epidermidis* (Hay)

FIG. 20

NIVELES DE BACTEREMIA 4 H DESPUÉS DE LA INFECCIÓN CON 3×10^9 DE *S. EPIDERMIDIS**



RATÓN CF-1 INFECTADO CON LA CEPA HAY-HuMAB DADO IPx2

FIG. 21

El efecto de HuMAB 96-110 sobre la supervivencia en un modelo de sépsis de *S. Epidermidis* neonatal letal

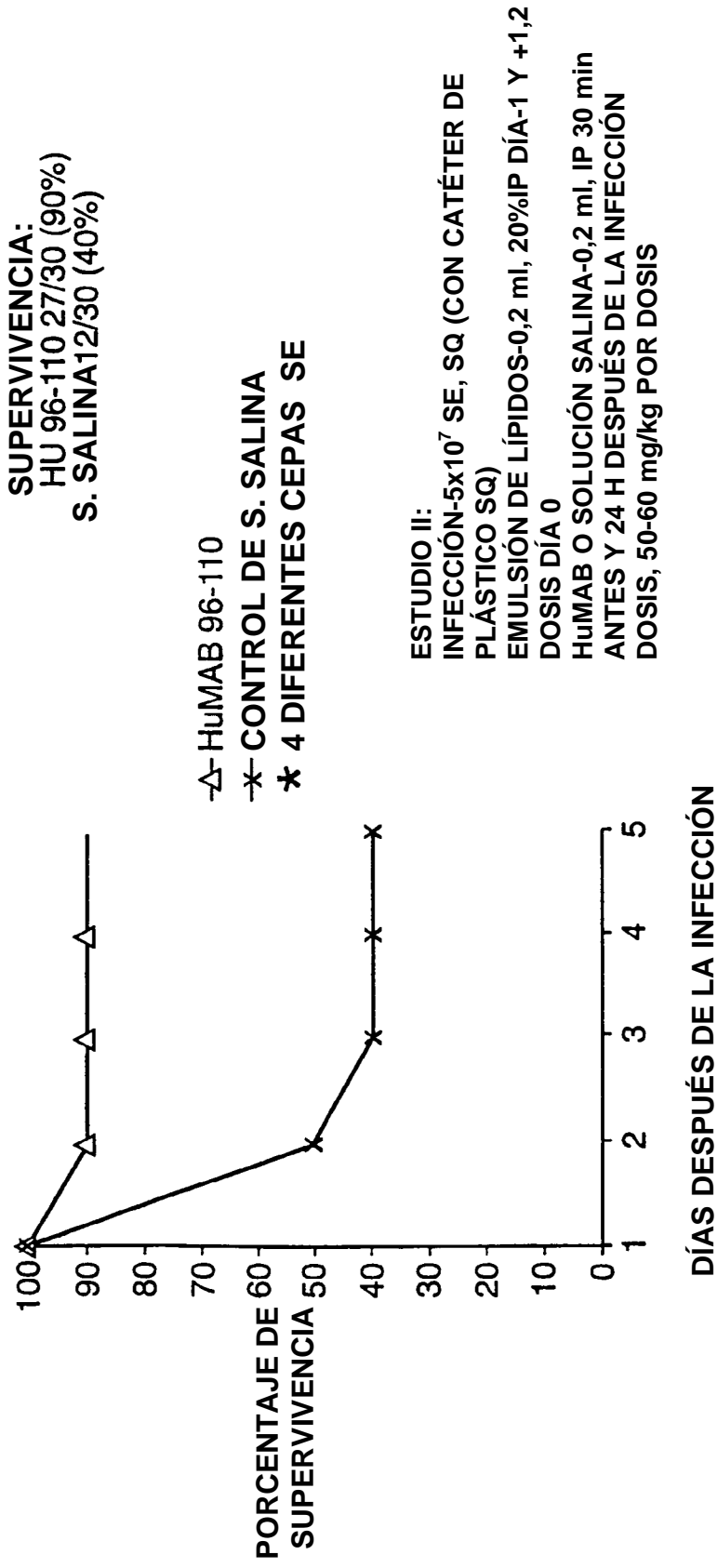


FIG. 22