

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 087**

51 Int. Cl.:
A61K 39/085 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05732793 .4**
96 Fecha de presentación: **08.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1740206**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.01.2007**

54 Título: **PHEP, UNA PERMEASA DE AMINOÁCIDO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.**

30 Prioridad:
29.04.2004 GB 0409559

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.11.2011

73 Titular/es:
**ABSYNTH BIOLOGICS LTD
40 LEAVYGREAVE ROAD
SHEFFIELD S3 7RD, GB**

72 Inventor/es:
FOSTER, Simon J.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 369 087 T3

DESCRIPCIÓN

Phep, una permeasa de aminoácido de staphylococcus aureus

La invención se refiere a polipéptidos antigénicos expresados por microbios patogénicos, a vacunas que comprenden los polipéptidos antigénicos y a anticuerpos terapéuticos dirigidos a los polipéptidos antigénicos. Los organismos microbianos causan una serie de enfermedades mortales y debilitantes que afectan a muchos millones de personas de todo el mundo. Los procedimientos actuales para controlar los organismos microbianos incluyen el uso de agentes microbianos (antibióticos) y desinfectantes. Se ha demostrado que éstos son problemáticos, ya que la exposición a estos agentes introduce una presión de selección significativa que tiene como resultado la creación de microbios resistentes que pueden evitar los efectos del (los) agentes antimicrobianos. Por ejemplo, se ha descubierto que los organismos microbianos se han convertido en resistentes a triclosán, un agente añadido a muchos desinfectantes usados en ambientes domésticos e industriales.

Un problema mayor problema argumentable es la revolución de las cepas resistentes a antibióticos de una serie de microbios patogénicos significativos.

Un ejemplo de un organismo patogénico que ha desarrollado resistencia a antibióticos es *Staphylococcus aureus*. *S.aureus* es una bacteria cuyo hábitat normal es el revestimiento epitelial de la nariz en aproximadamente el 20-40 % de las personas sanas normales y también se suele encontrar en la piel de las personas, normalmente si causar daños. No obstante, en ciertas circunstancias, en particular cuando existen daños en la piel, este germen puede causar infección. Este es un problema concreto en hospitales, donde los pacientes pueden estar sometidos a procedimientos quirúrgicos y/o estar tomando fármacos inmunosupresores. Estos pacientes son mucho más vulnerables a la infección por *S.aureus* por el tratamiento que han recibido. En los últimos años han aparecido cepas resistentes de *S.aureus*. Las cepas resistentes a meticilina son prevalentes y muchas de estas cepas resistentes también son resistentes a varios otros antibióticos. En la actualidad no existe un procedimiento de vacunación eficaz para *S.aureus*. En EE.UU., las infecciones por *S.aureus* son la causa del 13 % de los dos millones de infecciones hospitalarias anuales. Esto representa 260.000 personas con una infección por *S.aureus*, de las cuales 60-80.000 mueren.

Por tanto, *S.aureus* es un patógeno humano fundamental capaz de causar una amplia gama de enfermedades potencialmente mortales, incluidas septicemia, endocarditis, artritis y shock séptico. Esta capacidad viene determinada por la versatilidad del organismo y su arsenal de componentes implicados en la virulencia. La patogenidad es multifactorial y ni un componente se ha demostrado responsable de una infección concreta, véase Projan, S.J. & Novick, R.P. (1997) en *The Staphylococci in Human Disease* (Crossley, K.B. & Archer, G.L., eds.) pp.55-81.

Al principio de la infección y a medida que progresa, las necesidades y el entorno del organismo cambian y esto se traduce en una correspondiente alteración en los determinantes de virulencia que produce *S. aureus*. Al principio de la infección es importante que el patógeno se adhiera a los tejidos huésped y, por tanto, se forma un gran repertorio de proteínas de fijación asociadas con la superficie celular. Estas incluyen proteínas de unión a colágeno, fibrinógeno y fibronectina. El patógeno también tiene la capacidad de evadir las defensas de huésped mediante la producción de factores que reducen la fagocitosis o interfieren en la capacidad de las células para ser reconocidas por los anticuerpos en circulación.

A menudo se desarrolla un foco de infección y un absceso, y aumenta el número de organismos. *S. aureus* tiene la capacidad de controlar su propia densidad celular mediante la producción de un quórum del péptido de sensibilización. La acumulación del péptido, asociada con cambios fisiológicos producidos mediante el comienzo de la inanición de las células, provoca un cambio en la producción del determinante de virulencia desde las adhesinas a los componentes implicados en la invasión y la penetración en el tejido. Estas incluyen un amplio abanico de hemolisinas, proteasas y otras enzimas de degradación.

Durante el procedimiento de cualquier infección, los determinantes de virulencia producidos por *S. aureus* se producen en respuesta a estímulos ambientales y fisiológicos. Estos estímulos dependerán del nicho dentro del cuerpo y cambiarán a medida que la infección progrese. Se conoce poco de las condiciones in vivo y es probable que algunos componentes se produzcan únicamente en este ambiente. Por tanto, estos son posibles componentes de vacunas que no se descubrieron en las técnicas previas.

Muchas vacunas se producen con patógenos inactivados o atenuados que se inyectan en un individuo. El individuo inmunizado responde produciendo una respuesta humoral (anticuerpos) y celular (linfocitos T citolíticos, CTL). Por ejemplo, las vacunas para la hepatitis se fabrican inactivando el virus con calor y tratándolo con un agente de reticulación tal como formaldehído. Un ejemplo de un patógeno atenuado útil como vacuna está representado por las vacunas contra la polio, que se producen atenuando un patógeno vivo.

No obstante, el uso de organismos atenuados en vacunas para ciertas enfermedades es problemático debido a la ausencia de conocimientos sobre la patología de la afección y la naturaleza de la atenuación. Para ciertos agentes virales, esto es un problema concreto ya que los virus, en concreto los retrovirus, tienen un ciclo de replicación sensible a error que tiene como resultado mutaciones viables en los genes que comprenden el virus. Esto puede dar

como resultado alteraciones de los determinantes antigénicos previamente usados como vacunas.

El desarrollo de las denominadas vacunas de subunidad (vacunas en las que el inmunógeno es un fragmento o subunidad de una proteína o complejo expresado por un organismo patógeno concreto) ha sido el centro de considerables investigaciones médicas. La necesidad de identificar moléculas candidatas útiles en el desarrollo de vacunas de subunidad es evidente, no menos porque recientemente el desarrollo de resistencia a antibióticos ha obstaculizado los abordajes quimioterapéuticos para controlar los organismos patógenos

La invención se refiere a polipéptidos antigénicos de permeasa de fenilalanina (PheP) que se expresan durante una infección por un microbio patógeno y su uso en la vacunación. El documento US 2003/054436 A1 divulga polipéptidos de permeasa y su uso en vacunas.

Un polipéptido antigénico codificado por una secuencia de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en:

i) una secuencia de ácido nucleico como se muestra en la SEC ID N° 9 de la Figura 1 o la SEC ID N° 15 de la Figura 9;

ii) una secuencia de ácido nucleico como se indica en (i) que codifica un polipéptido expresado por *Staphylococcus aureus*;

iii) una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas y que es estable tras lavar en 0,1 x SSC, 0,1 % de SDS a 60 °C con la secuencia identificada en los puntos (i) o (ii) anteriores; y

iv) una secuencia de ácido nucleico que es degenerada como resultado del código genético de la una secuencia de ácido nucleico definida en (i), (ii) o (iii) para uso como medicamento.

En una realización preferida de la invención, el medicamento es una vacuna.

El ácido nucleico que codifica el polipéptido antigénico del primer aspecto de la invención puede hibridar en condiciones de hibridación rigurosas con la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 1 o la Figura 2 o con su hebra complementaria.

Las condiciones de hibridación/lavado rigurosas son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, los híbridos de ácido nucleico que son estables después de lavar en 0,1 x SSC, 0,1 % de SDS a 60 °C. En la técnica se sabe bien que las condiciones de hibridación óptimas se pueden calcular si se conocen las secuencias del ácido nucleico. Por ejemplo, las condiciones de hibridación se pueden determinar con el contenido de GC del ácido nucleico objeto de hibridación. Véase Sambrook y col. (1989) Molecular Cloning; A Laboratory Approach. Una fórmula habitual para calcular las condiciones rigurosas requeridas para conseguir la hibridación entre las moléculas de ácido nucleico de una homología especificada es:

$$T_m = 81,5 \text{ °C} + 16,6 \text{ Log } [\text{Na}^+] + 0,41 [\% \text{ G} + \text{C}] - 0,63 (\% \text{ formamida}).$$

El ácido nucleico que codifica el polipéptido antigénico del primer aspecto de la invención puede comprender la secuencia expuesta en la Figura 1 o 2 o una secuencia que es al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, por ejemplo 98% o 99%, idéntica a la secuencia de ácido nucleico indicada en la Figura 1 o 2 a nivel de residuo de ácido nucleico.

"Identidad", como se conoce en la técnica, es la relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, determinado comparando las secuencias. En la técnica, identidad también significa el grado de relación de la secuencia entre secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, como puede ser el caso determinado por la correspondencia entre cadenas de dichas secuencias. La identidad se puede calcular con facilidad (computational Molecular Biology, Lesk, A.M. ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). Aunque existe una serie de procedimientos para medir la identidad entre dos secuencias polinucleotídicas o dos secuencias polipeptídicas, el término es bien conocido para los expertos en la técnica (Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Los procedimientos habitualmente empleados para determinar la identidad entre las secuencias incluyen, entre otros, los divulgados en Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48. 1073 (1988). Se diseñan procedimientos preferidos para determinar la identidad para dar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. Los procedimientos para determinar la identidad se codifican en programas informáticos. Los procedimientos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, entre otros, el paquete del programa GCG (Devereux, J., y col., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Atschul, S.F. y col., J. Molec. Biol. 215: 403 (1990)).

El ácido nucleico que codifica el polipéptido antigénico del primer aspecto de la invención puede comprender el fragmento de una secuencia de acuerdo con el primer aspecto que tiene una longitud de al menos 30 bases, por ejemplo una longitud de 40, 50, 60, 70, 80 o 90 bases.

La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido antigénico del primer aspecto de la invención puede ser ADN genómico, ADNc o ARN, por ejemplo ARNm.

El polipéptido antigénico del primer aspecto de la invención puede ser una proteína de membrana celular, por ejemplo una proteína de membrana integral.

- 5 El polipéptido antigénico del primer aspecto de la invención puede tener actividad de permeasa. Como se usa en el presente documento, "permeasa" se refiere a una proteína de membrana celular que funciona como canal para el transporte de una molécula específica hacia dentro o hacia fuera de la célula.

10 Preferentemente, el polipéptido antigénico del primer aspecto de la invención está implicado en el transporte de uno o más aminoácidos hacia dentro o hacia fuera de la célula por ejemplo el polipéptido puede tener actividad de permeasa de fenilalanina.

Preferentemente, el polipéptido antigénico del primer aspecto de la invención se expresa en un organismo patógeno, por ejemplo una bacteria, virus o levadura. Preferentemente, el organismo patógeno es una bacteria.

La bacteria se puede seleccionar del grupo constituido por:

- 15 *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Enterococcus faecalis*; *Mycobacterium tuberculosis*; *Streptococcus grupo B*; *Streptococcus pneumoniae*; *Helicobacter pylori*; *Neisseria gonorrhoea*; *Streptococcus grupo A*; *Borrelia burgdorferi*; *Coccidioides immitis*; *Histoplasma capsulatum*; *Neisseria meningitidis tipo B*; *Shigella flexneri*; *Escherichia coli*; *Haemophilus influenzae*.

Preferentemente, la bacteria es del género *Staphylococcus spp.* Todavía preferentemente, la bacteria es *Staphylococcus aureus*.

- 20 En una realización preferida de la invención, el polipéptido antigénico del primer aspecto de la invención está asociado con la patogenicidad infecciosa de un organismo como se define en el presente documento.

En otro aspecto preferido de la invención, el polipéptido antigénico comprende toda, o parte de, la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 o 3.

- 25 Como se usa en el presente documento, "parte de" puede incluir un fragmento polipeptídico que puede tener una longitud de al menos 10, 15, 20 o 30 aminoácidos.

El polipéptido antigénico del primer aspecto de la invención puede comprender un antígeno no proteico, por ejemplo un antígeno polisacárido.

- 30 Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" significa, en términos generales, una pluralidad de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Se usa de forma intercambiable y significa el mismo péptido, proteínas, oligopéptido u oligómero. Con el término "polipéptido" también se pretende incluir fragmentos, análogos y derivados de un polipéptido en el que el fragmento, análogo o derivado conserva esencialmente la misma actividad o función biológica como proteína de referencia.

- 35 De acuerdo con un quinto aspecto de la invención se proporciona una vacuna que comprende al menos un polipéptido antigénico, o parte del mismo, de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Preferentemente, dicha vacuna comprende además un vehículo y/o adyuvante.

Como se usa en el presente documento, "parte del mismo" puede incluir un fragmento o subunidad del polipéptido antigénico en el que el fragmento o subunidad es suficiente para inducir una respuesta antigénica en un receptor.

La vacuna de acuerdo con el quinto aspecto puede ser una vacuna de subunidad en la que la parte inmunogénica de la vacuna es un fragmento o subunidad del polipéptido antigénico de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

- 40 Los términos adyuvante y vehículo se interpretan del siguiente modo. Algunos polipéptidos o antígenos peptídicos contienen epítopos de los linfocitos B pero no epítopos de linfocitos T. Las respuestas inmunológicas pueden potenciarse considerablemente mediante la inclusión de un epítipo de linfocito T en el polipéptido/péptido o mediante la conjugación del polipéptido/péptido a una proteína vehículo inmunogénica, tal como hemocianina de lapa californiana o toxoide del tétanos, que contienen múltiples epítopos de linfocitos T. El conjugado es captado por
45 las células presentadoras de antígenos, procesado y presentado por las moléculas de clase II de antígeno leucocitario humano (HLA). Esto permite que los linfocitos T mediante linfocitos T específicos de epítopos derivados del vehículo proporcionen ayuda a los linfocitos B específicos del polipéptido antigénico/péptido original. Esto puede llevar a un incremento de la producción de anticuerpos, secreción y cambio de isotipo.

- 50 Un adyuvante es una sustancia o procedimiento que aumenta las respuestas inmunitarias específicas de los antígenos modulando la actividad de las células inmunitarias. Ejemplos de adyuvantes incluyen, sólo como ejemplo, anticuerpos agonistas frente a moléculas coestimuladoras, adyuvante de Freund, dipéptidos de muramilo, liposomas. Por tanto, un adyuvante es un inmunomodulador. Un vehículo es una molécula inmunogénica que,

cuando se une a una segunda molécula aumenta las respuestas inmunitarias a esta última.

Preferentemente, el polipéptido antigénico del primer aspecto, o la vacuna del quinto aspecto, de la invención se puede liberar mediante inyección directa por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Todavía más, la vacuna o polipéptido antigénico pueden tomarse por vía oral. El polipéptido o vacuna se puede administrar en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como los diversos medios acuosos y lipídicos, tales como solución salina estéril, usados para preparar inyectables para administrar vía intramuscular o subcutánea. Se pueden emplear agentes de suspensión y de dispersión convencionales. Otros medios de administración, tales como implantes, por ejemplo una pastilla bioobservable de liberación sostenida de dosis bajas, serán evidentes para el experto en la técnica.

Preferentemente, la vacuna es contra la especie bacteriana *Staphylococcus aureus*.

También será evidente que las vacunas o polipéptidos antigénicos se eligen para prevenir o aliviar afecciones en animales que no sean seres humanos, por ejemplo, y no a modo de limitación, mascotas familiares (p. ej., animales domésticos, tales como gatos y perros), ganado (p. ej., vacas, ovejas, cerdos) y caballos.

En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un polipéptido antigénico de acuerdo con el primer aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de un trastorno asociado con *Staphylococcus aureus*.

Un trastorno asociado con *Staphylococcus aureus* puede incluir, por ejemplo, septicemia, tuberculosis, bacterias asociadas con intoxicación alimentaria, peritonitis; endocarditis, osteomielitis; sepsis, trastornos cutáneos, meningitis; neumonía; úlceras de estómago, gonorrea, estreptococos en la garganta, shock séptico asociado con estreptococos, fascitis necrotizantes, impétigo, histoplasmosis, enfermedad de Lyme; gastroenteritis, disentería, shigelosis.

A continuación se describirá una realización de la presente a modo de ejemplo únicamente en referencia a los materiales, procedimientos y figuras siguientes:

La Figura 1 muestra las secuencias de ADN (a, b y c), y las correspondientes secuencias de aminoácidos, que codifican supuestos bucles extracitoplasmáticos de una PheP de *Staphylococcus aureus*;

La Figura 2 muestra la secuencia de de una PheP de *Staphylococcus aureus*.

La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de ADN mostrada en la Figura 2.

Figura 4. Representación esquemática del locus pheP-katA. La dirección de la transcripción de pheP y katA se muestra con flechas grandes y supuestas estructuras terminadoras de la transcripción con bolas y barras. (A) 8325-4 (silvestre). (B) Mutante ST1 que muestra la inserción de Tn917 con la correspondiente delección de 380 pb de la región codificadora de 1542 pb del gen *pheP* y la delección de 1.329 pb de la región codificadora de 1419 pb del gen *katA*. (C) MJH600 (*pheP*) que muestra recolocación alélica.

Figura 5. Patogenicidad de las cepas de *S. aureus* en un modelo de absceso cutáneo murino de infección. Aproximadamente 10^8 ufc de cada cepa se inocularon por vía subcutánea en ratones BALB/C de seis a ocho semanas de edad: 8325-4 (silvestre) (n=10), ST1 (*pheP katA*) (n=10), MJH600 (*pheP*) (n=10) y PC1839 (*SarA*) (n=10). Siete días después de la infección se sacrificó a los ratones, se extirparon las lesiones y se homogeneizaron, y se contaron las bacterias viables tras la dilución y el crecimiento en placas de agar BH1 (3, 7). Se observó una recuperación significativamente reducida para ST1 (*pheP katA*) (0,15 %) (P<0,003), MJH600 (*pheP*) (1,9%) (P<0,003) y PC1839 (*sarA*) (0,04%) (P<0,003). La línea de puntos muestra el límite de la recuperación. La barra indica el valor medio de la recuperación. La significación estadística se evaluó en la recuperación de las cepas usando la prueba de la t de Student con un límite de confianza del 5 %.

Figura 6. Capacidades de supervivencia a la inanición de 8325-4 (silvestre) (■), ST16 (*katA*) (○) y MJH600 (*pheP*) (Δ) MJH621 (*pheP Pma143R*) (□) tras una incubación aeróbica prolongada en CDM limitante de glucosa (22). Las muestras se extrajeron asépticamente a los tiempos indicados y se evaluó la viabilidad mediante dilución y recuento de las colonias tras 14 de incubación en agar BHI. El experimento se repitió tres veces con resultados muy similares; se muestran los resultados de un experimento representativo.

Figura 7. Fenotipo de crecimiento y complementación de MJH600 (*pheP*). Las cepas se incubaron durante la noche en un ambiente microaeróbico en agar de suero de cerdo sin fenilalanina (A) o con fenilalanina (B) (concentración final 1 mM). Crecimiento de MJH620 (8325-4 pMALA3R) y MJH621 (*pheP Pma143R*) en agar de suero de cerdo (C). Para los estudios de complementación pMAL43 y Pma143R se sometieron a electroporación en 8325-4 (silvestre) y MJH600 (*pheP*). El gen *pheP* se clonó directamente en *S. aureus* debido a la toxicidad del gen en *E. coli*, que impidió la complementación de mutantes de transporte de *E. coli*.

Ejemplo

Detección selectiva de la biblioteca Tn917

La detección selectiva de mutantes con transposones en la biblioteca Tn917 de *S. aureus* con alteración en la capacidad de sobrevivir a la inanición por carbono identificó la cepa ST11. La secuenciación determinó que la inserción del transposón había producido una delección grande del gen *katA*, que codifica la catalasa, una delección más pequeña en el gen *pheP* transcrito de forma divergente, que codifica una posible permeasa de aminoácido

(Figura 4A, B).

Análisis del gen *PheP*

El análisis de la secuencia de *PheP* reveló que tiene doce regiones no contiguas de hidrofobicidad indicativas de dominios que atraviesan la membrana. La proteína tiene una homología significativa con los miembros de la superfamilia de poliaminoorganocatión de aminoácido (APC) de proteínas transportadoras (Jack y col. Microbiology. 146:1797-814 (2000) and Saier, M.H. Microbiology. 146:1775-1795 (2000)). La *PheP* de *S. aureus* exhibe mayor identidad de secuencia con LysP de *E. coli* (44,6%), que funciona como una permeasa de lisina y RocE (34,9 %) de *B. subtilis*, que funciona como permeasa de arginina y ornitina.

Cuando la virulencia de ST1 (*pheP katA*) se analizó en un modelo de infección de absceso murino se observó una recuperación significativamente reducida (0,15%) ($P < 0,003$) en comparación con la cepa parental isogénica, 8325-4. El nivel de recuperación para ST1 (*pheP katA*) fue similar al del mutante regulador de la virulencia, *sarA* (0.04%) ($P < 9,993$) (Figura 5). En contraste, la recuperación de ST16 (*katA*), como se ha descrito anteriormente (Horsburgh, y col. Infect. Immun. 69:3744-3754 (2001)), no fue significativamente diferente de la de 8325-4 (silvestre, lo que sugiere que la menor virulencia de ST1 (*pheP katA*) se debía a la inactivación del gen *pheP*.

Se construyó una mutante de recolocación alélica MJH600 (*pheP*) (Figura 4C) para determinar si la inactivación de *pheP* era el factor de contribución a la menor virulencia de ST1. La recolocación alélica se consiguió amplificando el gen *pheP* en los fragmentos anteriores y posteriores usando los cebadores CCAGAATTCTGCCAATGATTAAGTCTAATCG con ATGATGGTACCAGTAGCTACAAATAGACCAGTCC y AGAGGATCCGCATGTCGCAATCGTATTTGTGACC con GGACTGGTCTATTTCTAGCTACTGGTACCATCAT. El gen de resistencia a tetraciclina (*tet*) de pDG1513 (Guerot-Fleury, y col. Gene 167:335-336 (1995)) se amplificó usando el cebador CCGGTACCCGGATTTTATGACCGATGATGAAG con CCGGTACCTTAGAAATCCCTTTGAGAATGTTT. Tras la purificación, los tres productos diferentes de la PCR se digirieron con BamHI/KpnI, EcoRI/KpnI y KpnI, respectivamente y de forma simultánea se ligaron en pAZ106 digerido con BamHI/EcoRI (Kemp y col. J Bacteriol. 173:4646-4652 (1991), Sambrook y col. Se usó un clon resistente a tetraciclina, Pma132, para transformar el *S. aureus* RN4220 electrocompetente (Schenk, S. y R.A. Ladagga. Lett. 94:133-138 (1992)) y se resolvió mediante transducción de *S. aureus* 8325-4 usando $\phi 11$.

Estudios de mutantes de *PheP*

MJH600 (*pheP*) tenía una menor virulencia ($P < 0,003$) en comparación con 8325-4 (silvestre) cuando se analizó en un modelo de absceso murino (Figura 5). Esto demostró que la menor virulencia estaba asociada con la mutación de *pheP* y confirmó que el gen de la permeasa inactivado era el determinante responsable de la menor virulencia de ST1. La virulencia de ST1 (*katA pheP*) se redujo significativamente ($P < 0,02$) respecto a la de MJH600 (*pheP*), lo que sugiere que *katA* podría contribuir a la supervivencia en un mutante de *pheP*. MJH600 (*pheP*) mostró un perfil de exoproteína similar al de 8325-4 (silvestre), lo que descarta efectos fundamentales de la mutación sobre la expresión de factores de virulencia extracelular conocidos (datos no mostrados). La menor virulencia de MJH600 (*pheP*) se observó de forma similar en un modelo de infección en *Drosophila melanogaster* (A. Needham y S.J. Foster, datos no publicados).

Estudios de complementación de mutantes

ST16 (*katA*) tiene menor capacidad para sobrevivir sin glucosa (Horsburgh y col. Infect. Immun. 69:3744-3754 (2001) y Watson y col., J. Bacteriol. 180:1750-1758 (1998)). Dado que ST1 (*katA pheP*) tuvo menor supervivencia en comparación con ST16 (*katA*) durante la incubación aeróbica prolongada en DCM limitante de glucosa, se analizó la supervivencia a la inanición de MJH600 (*pheP*). MJH600 (*pheP*) perdía viabilidad más rápidamente que la cepa parental, de modo que tras cinco días la viabilidad fue diez veces menor que 8325-4 (silvestre) (Figura 6). La supervivencia se restableció mediante la presencia de pMAL43R, que contenía una copia de longitud completa del gen *pheP* en el vector de complementación pMK4 (Sullivan y col. Gene 29:21-26 (1984)) (Figura 6). El plásmido pMAL43R se construyó mediante PCR amplificando *pheP* usando el cebador GAGAGGATCCTAGATGGGAGACTAAATATGG con CACAGAATTCGAATGGTAACATGGTAATAAT; el producto se digirió con BamHI/EcoRI, se ligó en pMK4 y se clonó directamente en *S. aureus* RN4220

MJH600 (*pheP*) creció de forma similar a la presente cepa 8325-4 en medio nutritivo químicamente definido (CDM) en todas las condiciones analizadas (datos no mostrados). En contraste se observó un fuerte defecto de crecimiento en el agar suero de cerdo (Wiltshire y col. Infect. Immun. 69:5198-5202 (2001)) para MJH600 (*pheP*) en micro aerobiosis (5% CO₂, 87% N₂, 8% O₂) (Figura 7A) y condiciones anaerobias (Datos no mostrados); se observó crecimiento normal para el crecimiento aeróbico en agar de suero de cerdo. La adición de concentraciones micromolares de componentes del CDM identificó que la fenilalanina restableció completamente el crecimiento normal de MJH600 (*pheP*) (Figure 7B), lo que indica que el mutante de permeasa era probable que tuviera un defecto en la captación de fenilalanina. El defecto de crecimiento también se rescató mediante complementación usando Pma143R, lo que indica que sólo la mutación en *pheP* era la responsable del fenotipo observado (Figura 7C).

Conclusiones

- 5 La capacidad de *S. aureus* para secuestrar aminoácidos del huésped durante la infección parece ser una adaptación importante al crecimiento *in vivo*. *S. aureus* 8325-4 no es auxótrofo para la fenilalanina (Taylor, D. y K.T. Holland. J. Appl. Bacteriol. 66:319-329 (1989)). La biosíntesis no debe ser suficiente para satisfacer los requisitos para el crecimiento celular en un entorno tal como un absceso, de modo que se crea un requisito de captación de fenilalanina durante la infección.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido antigénico codificado por una secuencia de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en:
 - 5 i) una secuencia de ácido nucleico como se muestra en la SEC ID N° 9 de la Figura 1 o la SEC ID N° 15 de la Figura 9;
 - ii) una secuencia de ácido nucleico como se indica en (i) que codifica un polipéptido expresado por *Staphylococcus aureus*;
 - 10 iii) una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas y que es estable tras lavar en 0,1 x SSC, 0,1 % de SDS a 60 °C con la secuencia identificada en los puntos (i) o (ii) anteriores; y
 - iv) una secuencia de ácido nucleico que es degenerada como resultado del código genético de la una secuencia de ácido nucleico definida en (i), (ii) o (iii) para uso como medicamento.
2. Un polipéptido antigénico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es una vacuna.
3. Un polipéptido antigénico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido tiene actividad como permeasa.
- 15 4. Un polipéptido antigénico de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el polipéptido tiene actividad como permeasa de fenilalanina.
5. Un polipéptido antigénico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido es expresado por *Staphylococcus aureus*.
- 20 6. Un polipéptido antigénico de acuerdo con la reivindicación 1, en el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 10 de la Figura 1 o la SEC ID N° 16 de la Figura 3.
7. Una vacuna que comprende al menos un polipéptido antigénico de acuerdo con la reivindicación 1.
8. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la vacuna comprende un vehículo y/o adyuvante.
9. Uso de un polipéptido antigénico de acuerdo con la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de un trastorno asociado con *Staphylococcus aureus*.
- 25 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el trastorno asociado con *Staphylococcus aureus* incluye septicemia, tuberculosis, bacterias asociadas con intoxicación alimentaria, peritonitis; endocarditis, osteomielitis; sepsis, trastornos cutáneos, meningitis; neumonía; úlceras de estómago, gonorrea, estreptococos en la garganta, shock séptico asociado con estreptococos, fascitis necrotizantes, impétigo, histoplasmosis, enfermedad de Lyme; gastroenteritis, disentería y shigelosis.
- 30

Figura 1

- (a) LYFWDTFKFFHPIT (SEC ID N° 10)
CTTTATTTCTGGGACACATTTAAATTTTCCACCCCATTACT (SEC ID N° 9)
- (b) GHTYGFENYTKGQAPFVG (SEC ID N° 12)
GGTCATACATATGGATTTGAAAACATACAAAAGGCCAAGCACCGTTTGTTGGT (SEC ID N° 11)
- (c) PYTDPSLLRASSSISQSPFTI (SEC ID N° 14)
CCGTACACAGATCCATCATTATTAAGAGCAAGTAGTTCAATAAGTCAAAGCCCATTACAAATT
SEC ID N° 13)

Figura 2

ATGGAAGATAATAAAATGAACCGTAGTCTTAACTCAAGACACATTTCCATGATTGCTATA
 GGTGGTGCAATTGGGACTGGTCTATTTGTAGCTACTGGTAATATCATTTCTCAAGCTGGT
 CCTGGAGGCGCTATACTCGCTTATCTTGTTATTGGTGTCATGCTATATTTCTTAATGTCA
 TCAATTGGAGAGTTGGCAACATTTTATCCAGTATCAGGTTCAATTCAGCTCTTATTCAACA
 CGCTTTATTGACTCATCTCTTGGCTTTACCATGGGATGGTTGTATTGGGCATTGTGGTCA
 TTAGTTACAAGTGTTGATGTCATAGTAGCGTCAAATGTGCTTTATTTCTGGGACACATTT
 AAATTTTCCACCCCATTAATTGGAGCTTAATCTTTATTACAATTTTACTATTATTAAAC
 ATTTTTTCTGTAAAATCAFTTGGAGAACTGAGTTTTGGTTATCATTGATTAAAGTGTTA
 ACAATTATCGTATTCGTATTTTTTGGCTTTTTTAATGATTTTCGGTATCTTAGGTGGTCAT
 ACATATGGATTTGAAAACATACAAAAGGCCAAGCACCGTTTGTGGTGGTATCTCTGGT
 TTCTTAGGCGTATFATTAGTCGCCGGATTTTCGGTTGGTGGTACAGAAGTAGTAGCAGTA
 ACTGCTGGTGAATCAGATGACCCTAAAAAGTCTATGCCTAAGGCAATTAAACAAGTATTT
 TGGCGTATTCTTTTATTCTATGTCTTATCAATTGCAGTAATTGGTGCAATTATTCGGTAC
 ACAGATCCATCATTATTAAGAGCAAGTAGTTCAATAAGTCAAAGCCCATTTACAATTGTA
 TTCGATAGAGTAGGCATAGCCTTTGCAGCATCAGTAATCAACGCGGTATTTTAACTTCA
 TTATTATCCGCTGCAAATTCAGGTGTTTATACAACAGGCAGAATGTTGTATTCTTAAAGT
 TCAGACAAAAAAGCACCCCAATTTTAAAGTAAATTAAACAAGACAACTAAGTTACCTTTA
 AGAGCATTATTAACCTACTTATGCAGTCGTTGTTATTGTTATTATTTATGCAAACCTTTAAT
 TCAAATGCCGTTTTTAAATTTACTTGAAATTATTGGTTCAATGATTATAGTTGTTTGGGGA
 TCAAGCATTTGGTTCACAAATACGATTGCGACAAGCTATTAAAAACAAGGTCAAGACCCT
 AATAAGGTCCTACCATATAAAGCACCTTTTTTATCCATTAGGACCAATCATTGTCATCACT
 AACTATTATTCTTGCTATTTGGTGGCTCAGTTGAATATATTTTAAAAGATCAATGGTTA
 AATGCTTTTAAAAACTTTTTACCTTTAATCATTCTAGCGTTGATTTACTTTATTTCATAAA
 ATCATTACAAAAAATAAATTTGTAAAGCTAGAAACAATTAATTTAAAACCACACGATTAT
 GACAATCAAAAATAA (SEC ID N° 15)

Figura 3

MEDNKMNRSLNSRHISMIAIGGAIGTGLEFVATGNIISQAGPGGAILAYLVIGVMPLYFLMS
 SIGELATFYPVSGSFSSYSTRFIDSSLGFTMGWLYWALWSLVTSDVIVASNVLYFWDTF
 KFFHPITWSLIFITILLLLNI~~FS~~VKS~~F~~GETEFWLSLIKVLTIIVFVIFGFLMIFGILGGH
 TYGFENYTKGQAPFVGGISGFLGVLLVAGFSVGGTEVVAVTAGESDDPKKSMPKAIKQVF
 WRILLFYVLSIAVIGAIIPYTDPSLLRASSSISQSPFTIVFDRVGIAFAASVINAVILTS
 LLSAANS~~GV~~YTTGRMLYSLSSDKKAPQFLSKLNKTTKLPLRALLTTYAVVVIVIIYANFN
 SNAVENLLEIIGSMIIVVWGSS~~I~~WSQIRLRQA~~I~~KKQGD~~PN~~KVL~~PY~~KAPFYPLGPIIVIT
 TLLFLLFGGSVEYILKDQWLNAFKNFLPLIILALIYFIHKIIHKTKFVKLETINLKPHDY
 DNQK

(SEC ID N° 16)

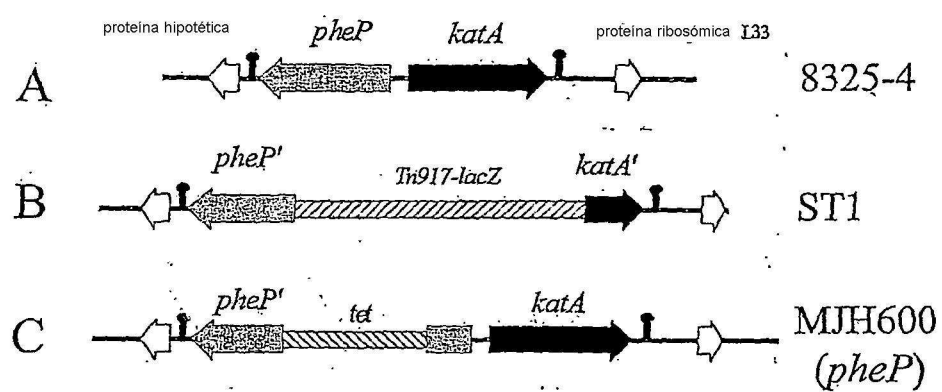


Figura 4

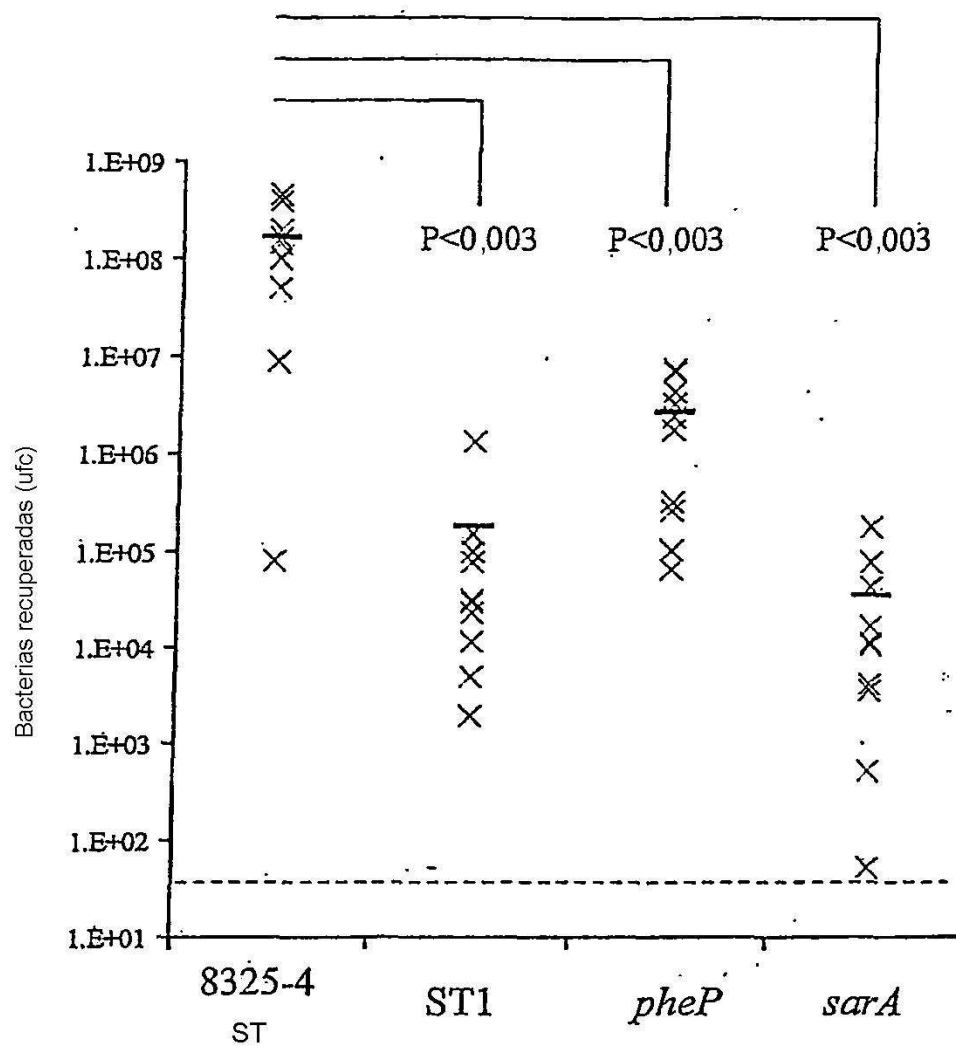


Figura 5