



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 382 422**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)	C12N 1/21 (2006.01)
C07K 14/31 (2006.01)	C07K 16/12 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)	A61K 31/70 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)	A61K 39/085 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)	A61K 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01907437 .6**

96 Fecha de presentación : **08.01.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1244790**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.10.2002**

54

Título: **Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos con actividad CHIPS.**

30

Prioridad: **07.01.2000 EP 00200068**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2012

73

Titular/es: **Alligator Bioscience AB (publ)**
Scheelevagen 19A
223 70 Lund, SE

72

Inventor/es:
Van Strijp, Johannes Antonius Gerardus;
Van Kessel, Cornelis Petrus Maria y
Peschel, Andreas Paul

74

Agente/Representante:
Urizar Anasagasti, José Antonio

ES 2 382 422 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

Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos con actividad CHIPS.

5 La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un (poli) péptido con actividad CHIPS. La invención también se refiere al uso de la información contenida en el ácido nucleico para la preparación del (poli) péptido correspondiente y a los vectores y huéspedes para uso en el mismo. La invención en adición se refiere a moléculas no (poli) péptidos que tienen una estructura y función similar a la de los (poli) péptidos. El (poli) péptido que tiene actividad CHIPS que está codificado por la molécula de ácido nucleico de la invención puede ser
10 utilizado en el tratamiento de reacciones de inflamación. Los (poli) péptidos y no (poli) péptidos pueden en adición ser utilizados para inhibir la activación de leucocitos y células endoteliales.

15 Los leucocitos se dedican principalmente a la protección del cuerpo contra invasores foráneos (ej., bacterias, virus, hongos y células cancerosas). Las células más importantes son los linfocitos, monocitos y neutrófilos. Los linfocitos forman el sistema inmune específico y causan reacciones inmunes contra los invasores. Su tarea más importante es construir memoria específica contra el invasor, de modo que la próxima vez que el invasor entra al cuerpo es reconocido, muerto y eliminado rápidamente. Algunas veces estos linfocitos no solo atacan a los invasores, también reaccionan contra ciertas estructuras y/o moléculas (llamadas autoantígenos) del propio cuerpo, que causan enfermedades auto-inmunes (ej., la artritis reumatoide). La matanza y eliminación de los invasores se hace principalmente por monocitos
20 y neutrófilos, células del sistema inmune innato, mediante reconocimiento directo de los invasores o con la ayuda de linfocitos específicos.

25 En contraste con la delicada red de las reacciones afinadas y controladas de linfocitos, las células del sistema innato reaccionan de una manera relativamente no específica y agresiva. Ya que son parte de la primera línea de defensa del cuerpo, su tarea más importante es matar y eliminar el agente invasor tan pronto como sea posible. Esto se lleva a cabo a través de sustancias muy agresivas (ej., radicales libres y enzimas) que no solo son letales para el invasor, sino también causan daño a las células huéspedes en las proximidades. Sustancias de estas células dañadas y las células activadas localmente del sistema innato en sí atraerán además un número creciente de neutrófilos y monocitos, causando inflamación local. En muchos casos, tal reacción inflamatoria agresiva y perjudicial, causada por neutrófilos
30 sobreactivados, es innecesaria. En algunos casos esta respuesta inflamatoria es responsable de trastornos graves, a veces letales e incluye condiciones como el Síndrome de Dificultad Respiratoria Adulta (SDRA), daño severo del tejido después de eventos tromبóticos tales como ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares, enfermedades inflamatorias del intestino y artritis reumatoide. La inflamación disminuirá una vez que todos los invasores han sido muertos y eliminados, juntos con las diversas células muertas en el proceso. La curación de la herida, causada por la respuesta inflamatoria, puede entonces empezar. Aunque hay algún solapamiento en función, la tarea principal de los neutrófilos es atacar a los invasores y la tarea principal de los monocitos es eliminar los desechos resultantes de este
35 ataque. En adición, los neutrófilos tienen otra tarea pacífica en la asistencia al proceso de cicatrización de la herida.

40 Cuando las bacterias han invadido el cuerpo y, por ejemplo, infectado el sistema nervioso central (como en la meningitis) empiezan a producir sustancias microbianas, que incluyen los polipéptidos formilados (como el péptido fMLP). Otras sustancias de origen microbiano activan el complejo enzimático convertasa factor de complemento 5 (C5), que convierte el C5 del sistema de complemento en su forma activada C5a. Ambos C5a y fMLP son quimio-atrayentes: sustancias que pueden activar y atraer células de los vasos sanguíneos (el proceso de migración). Los neutrófilos responden a estas dos sustancias y también a la interleucina -8 (IL-8). Esta "quimioquina" (el nombre
45 dado a los quimio-atrayentes que son producidos por células del sistema inmune) es producida principalmente por monocitos activados (pero también en pequeñas cantidades por los propios neutrófilos activados). Los neutrófilos interactúan con estas sustancias, debido a que tienen receptores para estas sustancias en el exterior de su membrana celular.

50 Los neutrófilos activados pueden fácilmente migrar de los vasos sanguíneos. Esto es debido a que los quimio-atrayentes, productos microbianos y sustancias de monocitos activados habrán incrementado la permeabilidad de los vasos y estimulado las células endoteliales de las paredes de los vasos para expresar ciertas moléculas de adhesión. Los neutrófilos expresan selectinas e integrinas (ej., CD11b/CD18) que se unen a estas moléculas de adhesión. Una vez que el neutrófilo se adhirió a las células endoteliales, es capaz de migrar a través de las células, bajo la dirección
55 de quimio-atrayentes/quimioquinas, hacia el sitio de infección, donde la concentración de estas sustancias está a su nivel más alto. Estas sustancias también activan neutrófilos para producir una gama de otras moléculas, algunas de las cuales atraen más neutrófilos (y subsecuentemente monocitos), pero, en su mayoría, son responsables de destruir las bacterias invasoras. Alguna de estas sustancias (ej., radicales libres, enzimas que descomponen las proteínas (proteasas) y membranas celulares (lipasas)) son tan reactivas y no específicas que células del tejido circundante (y los neutrófilos en sí) son destruidas, causando daños en los tejidos. Este daño es exacerbado por la presencia de fluido derivado de la sangre que ha traspasado la pared del vaso con fugas y es responsable de la hinchazón que siempre
60 acompaña a la inflamación (llamada edema). La acumulación de presión causada por este exceso de fluido resulta en el daño celular adicional y muerte.

65 Más tarde en el proceso inflamatorio, los monocitos migran a la escena y se activan. Además de su labor en la eliminación de bacterias y desechos celulares, también producen sustancias tales como el factor de necrosis tumoral (TNF) e IL-8, que a su vez atrae más neutrófilos activados, causando daños locales adicionales. TNF también tiene un efecto estimulador directo en los neutrófilos. Una vez que todos los invasores han sido eliminados, la respuesta infla-

matoria disminuirá y el área se despejara de las “víctimas” restantes. Entonces comienza el proceso de cicatrización de la herida. Aunque se sabe que los neutrófilos juegan un papel fundamental en la cicatrización de heridas, no está claro qué sustancias derivadas de los neutrófilos están implicadas y cómo los neutrófilos están activos en la cicatrización sin ser agresivos para el tejido circundante. En general, el tejido dañado será reemplazado por tejido cicatricial formado principalmente de fibroblastos y colágeno. Cuando ocurre la inflamación en áreas del cuerpo con una importante función, como los tejidos formados a partir de células del músculo del corazón, las células del cerebro o las células alveolares del pulmón, la función normal se verá comprometida por la formación de la cicatriz resultante, causando serios trastornos como insuficiencia cardíaca, parálisis y enfisema. Para minimizar las consecuencias debilitantes de estos trastornos, es importante “amortiguar” la reacción inflamatoria lo más rápidamente posible.

La intervención para controlar la respuesta inflamatoria aguda de fase temprana presenta una oportunidad para mejorar el pronóstico para una amplia variedad de pacientes cuyos síntomas pueden reconocerse como procedentes de tal evento. Este enfoque ha sido defendido para muchas enfermedades basadas en inflamaciones crónicas y agudas y que tienen potencial basado en descubrimientos de modelos relevantes de enfermedades. Medicamentos anti-inflamatorios clásicos tales como esteroides y Medicamentos Anti-Inflamatorios No Esteroides Anti-Inflamatorios (MAINEAIS) no tienen el perfil ideal de acción, ya sea en términos de eficacia o seguridad. Los esteroides afectan el tipo de células “equivocado” (monocitos) y sus efectos de amortiguación son fácilmente evitados. MAINEAIS generalmente muestran un efecto relativamente leve en parte debido a que intervienen en una etapa tardía en el proceso inflamatorio. Ambas clases de medicamentos producen una serie de efectos secundarios indeseables resultantes de otros aspectos de su actividad farmacológica. Los medicamentos que actúan directamente y específicamente para evitar la migración y activación de neutrófilos pueden tener un número de ventajas. Varios medicamentos en desarrollo temprano solo interfieren con un aspecto individual de la activación de neutrófilos (ej., inhibidores de la convertasa C5, anticuerpos contra C5a, medicamentos bloqueantes de receptores C5a) y migración (anticuerpos contra integrinas (como CD11b/CD18) y L-selectina en neutrófilos y anticuerpos contra moléculas de adhesión (como ICAM-1 y E-selectina) en células endoteliales). Los anticuerpos contra TNF y IL-8 tienen efectos en la inflamación crónica, pero solo efectos marginales en la inflamación aguda, debido a la función mínima que los monocitos (que son principalmente responsables de la producción de estas sustancias) juegan en la fase aguda.

A veces, la causa de la inflamación aguda no puede ser eliminada y la inflamación se vuelve crónica. Con excepción de la tuberculosis, hepatitis crónica y otras condiciones, esto es raramente el caso de las infecciones. Sin embargo, la inflamación crónica puede también ser causada por estímulos diferentes que las bacterias, tales como reacciones autoinmunes. La investigación ha demostrado que en la inflamación crónica el papel de los monocitos es mucho más prominente, y que la migración y activación de neutrófilos, la migración y activación del monocito, el daño tisular, la eliminación de células muertas y la curación de la herida van todos al mismo tiempo. Esta compleja cascada de interacciones entre células y muchas diferentes citocinas y quimiocinas ha sido el objeto de investigación intensiva durante muchos años. Se creyó que los monocitos y sus productos eran los elementos más importantes que necesitaban ser inhibidos para amortiguar la inflamación crónica. Esto explica por qué los esteroides, que interactúan específicamente con los monocitos, son generalmente más efectivos en la inflamación crónica que en la aguda. El tratamiento a largo plazo con esteroides sin embargo, no es una opción deseable, debido a que pueden ocurrir efectos secundarios graves e inaceptables a las dosis requeridas para producir un efecto clínico. Los nuevos tratamientos con anticuerpos contra TNF o IL-8 han demostrado buenos resultados, y fueron vistos inicialmente como una prueba del papel importante que se pensó que los monocitos jugaban en la inflamación crónica. La investigación reciente pone en duda un papel exclusivo para los monocitos en la inflamación y apunta a un papel crítico para los neutrófilos, que se ve ahora que representan mejores objetivos para la intervención terapéutica.

La causa subyacente de una enfermedad inflamatoria crónica no siempre es clara, y la causa original puede no siempre ser responsable de la recurrencia futura. Algunos científicos creen que en ciertas enfermedades inflamatorias crónicas hay un ciclo continuo de eventos. Su idea es que los neutrófilos y monocitos activados existentes continuamente atraen y activan nuevos grupos de células, perpetuando de este modo la respuesta inflamatoria incluso cuando los estímulos iniciales ya no están presentes. Esto sugeriría que un tratamiento agudo o periódico con un inhibidor eficaz de la activación del neutrófilo y monocito pararía el ciclo de reclutamiento de células nuevas, llevando en su debido tiempo a la modificación de la progresión de la enfermedad, o incluso a una cura completa, y no solo un alivio sintomático.

En la investigación que condujo a la presente invención un nuevo agente con propiedades inhibitorias de la inflamación se encontró en el medio extracelular de crecimiento de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Este agente es el objeto de la solicitud co-pendiente PCT/NL99/00442. Este agente se encontró que era capaz de bloquear directa o indirectamente diferentes receptores de quimioquinas. La incubación de diferentes células con el medio resultó en una expresión reducida en gran medida de un número de los receptores de quimioquinas, tanto de la expresión de los receptores de agentes quimiotácticos clásicos como el fMLP y C5a en granulocitos y de la expresión de receptores CXCR4 y CCR5 en linfocitos, monocitos y macrófagos. La reducida expresión del receptor estaba relacionada con la quimiotaxis reducida a gran medida relativa a las quimioquinas, así como a una infección reducida con HIV.

La actividad de la proteína está ya manifiesta en el cultivo supernatante del crecimiento de *S. aureus*. La proteína activa podría estar más purificada, por ejemplo por medio de un número de columnas Ligand Dye. Se realizó primero una pre-purificación en la llamada “columna amarilla” (tinte ligando “Reactivo Amarillo 86” reticulado 4% columna de agarosa perlada (Sigma)), seguido por una columna de absorción cromatográfica (la llamada “columna verde” (tinte ligando “Reactivo Verde 19” reticulado 4% columna de agarosa perlada (Sigma)) y una columna de ADN (Celulosa

ES 2 382 422 T3

ADN (Pharmacia)). Estas últimas columnas pueden ser intercambiadas. La columna ADN elimina un contaminante con el mismo peso molecular que la proteína. La columna de absorción cromatográfica concentra la proteína y es selectiva para la proteína. Finalmente, una post-purificación también tiene lugar por medios de filtración de gel y cromatografía de intercambio de aniones (MonoQ, Pharmacia). En la filtración de gel la proteína con el peso molecular de unos 17 kDa es seleccionada. Esta es la proteína que se encontró que tenía propiedades inhibitorias de quimiotaxis. Debido a que esta proteína es aislada del supernatante de la *Staphylococcus aureus* y da inhibición de las quimiotaxis, esta proteína fue llamada “CHIPS”: “CHEmotaxis Inhibitory Protein from *Staphylococcus aureus*” Proteína Inhibidora de Quimiotaxis del *Staphylococcus aureus* (también referido aquí como “CHIPS original”).

El aislamiento de la proteína CHIPS fuera del supernatante de *S. aureus* no es muy rentable. En adición, es deseable para el uso práctico de CHIPS en terapia que la parte activa de la proteína esté aislada. Moléculas más pequeñas de proteínas o péptidos tienen un riesgo reducido de inducir una respuesta inmunológica en un sujeto que recibe la proteína o péptido durante la terapia. Además, es deseable que sea capaz de modificar la proteína o péptidos para incrementar la actividad biológica y/o disminuir la inmunogenicidad de la misma.

Es por lo tanto el objeto de la presente invención proporcionar los medios para la producción de la proteína CHIPS original u otros (poli)péptidos correspondientes que tienen actividad CHIPS, así como fragmentos funcionales, derivados o análogos de los mismos que no sea por aislamiento de la célula huésped producida naturalmente.

La presente invención por tanto proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un (poli)péptido que tiene actividad CHIPS, dicha secuencia de nucleótidos correspondiendo a una secuencia que se seleccionada del grupo consistente de:

- a) una secuencia de nucleótidos que comprende al menos parte de la secuencia que se muestra en la Figura 4 (SEC ID NO 4);
- b) secuencias de nucleótidos que codifican un (poli)péptido con actividad CHIPS y con la secuencia de amino ácido mostrada en la Figura 5 (SEC ID NO 5);
- c) secuencias de nucleótidos que son al menos 40% idénticas a cualquiera de las secuencias de nucleótidos a) o b);
- d) secuencias de nucleótidos que hibridizan en condiciones estrictas con cualquiera de las secuencias de nucleótidos a), b), o c), y
- e) secuencias de nucleótidos complementarias a cualquiera de las secuencias a), b), c) o d), donde las condiciones estrictas en el paso d) consisten en la hibridización repentina a 42°C en 5xSSC y lavado a 65°C en 0.1xSSC, y donde la actividad CHIPS es la capacidad de perjudicar específicamente la unión del ligando-(c5a o fMLP).

En cuanto a la identidad u homología, como se menciona en el punto d) debe notarse que para alineamientos espaciados, pueden estimarse parámetros estadísticos utilizando el algoritmo de Smith-Waterman que produce resultados óptimos de alineación. Homólogos de la secuencia de ácido nucleico o secuencia de proteína CHIPS están definidos por una Penalización Abierta Espaciada de al menos 12 y una Penalización de Expresión Espaciada de al menos 1.

“Actividad CHIPS” se define en este documento como la capacidad de impedir específicamente por lo menos las respuestas inducidas por ambos fMLP y C5a, incluyendo al menos impedimento de la unión del ligando-(C5a o fMLP), y opcionalmente el impedimento de la quimiotaxis y la activación celular (ej., movilización de calcio). Sin embargo los (poli)péptidos pueden en adición tener otras actividades biológicas, tales como un efecto inhibitor en la activación de leucocitos y células endoteliales.

En la descripción que sigue los términos “proteína CHIPS” y “gen CHIPS” o “gen chp” son utilizados por la proteína aislada del supernatante de la forma natural de *S. aureus*, y su gen aislado, respectivamente. “(Poli)péptido con actividad CHIPS” y “molécula de ácido nucleico que codifica un (poli)péptido con actividad CHIPS” son utilizados para todo otro correspondiente (poli)péptido y molécula de ácido nucleico que están de alguna manera relacionados a o derivados de la proteína o gen CHIPS pero tienen un amino ácido o secuencia de nucleótidos que no es idéntica al mismo. La actividad CHIPS como se define más arriba es una característica inherente de los presentes (poli)péptidos. Este efecto será demostrado por la proteína CHIPS en el Ejemplo 5.

La secuencia como dada en la Figura 4 (SEC ID NO 4) es la secuencia ADN como aislada según la invención. Comprende una región promotora de nucleótidos de 1 a 40, una secuencia líder de péptidos de nucleótidos de 41 a 124, la región codificante para el (poli)péptido teniendo actividad CHIPS del nucleótido 125 al 490, así como una región sin traducir 3' para los nucleótidos 491 al 603.

En una primera realización de la invención, la molécula aislada de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que corresponde a nucleótidos de 1 a 490 de la Figura 4. En una realización alternativa la región promotora ya no está presente. En esta realización la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico corresponde a los

nucleótidos 41 a 490 de la Figura 4. Con esta molécula de ácido nucleico puede usarse una secuencia promotora diferente y/o otras secuencias de transcripción regulatorias. La elección de una promotora y/o otras secuencias regulatorias depende de las condiciones en las que la transcripción tomará lugar. El experto en la materia es capaz de seleccionar una promotora adecuada y/o otras regiones de transcripción regulatoria.

El gen CHIPS aislado de la Figura 4 o cualquier ácido nucleico derivado del mismo puede por ejemplo ser vinculado operativamente al sistema de expresión *trc* (Brosius *et al.*, Gen 27:161-172 (1984)). Muchas otras secuencias adecuadas de control de expresión y métodos de expresión de proteínas recombinantes son conocidas (F.M. Ausubel *et al.*, Protocolos Actuales en Biología Molecular, Jhon Wiley E hijos, Inc., Nueva York, N.Y.).

La secuencia de nucleótidos como se da en la Figura 4 también contiene una secuencia de péptido líder. La región codificante de la proteína madura correspondiente a los nucleótidos 125 a 490 de la Figura 4. Otras secuencias líderes pueden ser utilizadas. O la secuencia líder puede ser omitida en su totalidad, dependiendo de la célula huésped en que la secuencia debe ser expresada.

La secuencia de amino ácido en la Figura 5 es deducida de la secuencia de ADN en la Figura 4. En otra realización de la invención la molécula de ácido nucleico por lo tanto puede tener una secuencia de nucleótidos que corresponde a todas las variantes degeneradas del gen CHIPS aislado.

También se describen aquí las moléculas de ácido nucleico que codifican (poli)péptidos que no tienen la secuencia completa de la Figura 5 sino una o más porciones funcionales de los mismos que en si mismas o en conjunto constituyen un (poli)péptido biológicamente activo con actividad CHIPS. Tales porciones pueden variar en tamaño desde la secuencia de aminoácido completa menos un amino ácido a péptidos de al menos 2, preferiblemente al menos 5 amino ácidos. En caso de que la parte activa de la proteína descansa en dos o más porciones de la secuencia de amino ácido completa, la secuencia de ácido nucleico puede codificar estas porciones separadas de una forma que lleve a una configuración de péptido que retenga la actividad biológica. En la práctica esto puede por ejemplo significar que las secuencias espaciadoras deben ser incorporadas entre las porciones biológicamente activas para dar lugar a una conformación biológicamente activa.

Por lo tanto, cuando se haga referencia a "al menos parte de la secuencia" esto significa no solo las tres partes descritas anteriormente (e.d. nucleótidos 1-490, 41-490 y 125-490) sino también a otros fragmentos del gen o combinaciones de los mismos siempre que todavía codifiquen un (poli)péptido con actividad CHIPS. También se describe en este documento una molécula de ácido nucleico aislada de la invención que consiste en la región codificante de uno o más porciones de la secuencia de amino ácido de la Figura 5, donde una porción de la secuencia de amino ácido constituye sola o con otras porciones de la secuencia de amino ácido la(s) región(es) del (poli)péptido con actividad CHIPS que dan lugar a la actividad biológica.

La presente invención no esta limitada a moléculas de ácido nucleico que tienen la misma secuencia exacta como la secuencia mostrada en la Figura 4 o las variantes descritas más arriba de la misma. Por lo tanto, según la invención son proporcionadas moléculas de ácido nucleico adicionales con una secuencia de nucleótido que es al menos 40%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, incluso más preferiblemente al menos 70%, mayormente preferible 80%, y lo más preferible al menos 90% idéntica a cualquiera de las secuencias de nucleótidos según a), b) o c).

Se encontró que CHIPS es menos de 40% homólogo con proteínas y péptidos conocidos hasta la fecha. Las proteínas y péptidos que muestran al menos 40% de homología de aminoácidos a la proteína CHIPS y tienen la actividad CHIPS por tanto son también parte de esta invención.

La invención además se refiere a moléculas de ácido nucleico con secuencia de nucleótido que se hibridizan bajo condiciones estrictas con una molécula de ácido nucleico que corresponde con la secuencia de nucleótido dada en la Figura 4 o secuencias degeneradas de la misma, que codifican una secuencia de amino ácido como la dada en la Figura 5. Las condiciones rigurosas están constituidas por la hibridación repentina a 42°C en 5xSSC (SSC = 150 mM NaCl, 15 mM citrato trisódico) y lavado a 65°C a 0.1xSSC. En adición a 5xSSC la solución de hibridación puede comprender 50% de formamida, 50 mM de fosfato de sodio (pH 7.6), 5x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 g/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento no están limitadas al gen que codifica el (poli)péptido con actividad CHIPS, sino que también se refieren a moléculas de ácido nucleico que codifican fragmentos, derivados y análogos del mismo. Los "fragmentos" se pretende que abarquen todas las partes del (poli)péptido que retiene su actividad biológica. Los "fragmentos" pueden consistir de una secuencia de aminoácidos consecutivos o de más de una de estas secuencias. Los "derivados" son el (poli)péptido completo con actividad CHIPS o fragmentos del mismo que son modificados de alguna manera. Ejemplos de modificaciones seguirán abajo. Los "análogos" son (poli)péptidos similares con actividad CHIPS aislada de otros organismos, en particular otros organismos patógenos. Todas las categorías anteriores tienen una cosa en común, en concreto que tienen "actividad CHIPS". La actividad CHIPS puede ser medida por cualquier ensayo que muestre migración directa de leucocitos hacia un estímulo quimiotáctico apropiado. Ejemplos de tales ensayos incluyen la técnica bajo agarosa (como se ejemplifica en Balasoiu, *et al.*, Diabetes care 20: 392-395 (1997)), técnicas de cámara Boyden modificadas y sistemas trasnwell. La ultima técnica está adicionalmente ilustrada en los ejemplos.

ES 2 382 422 T3

Por tanto, para la presente aplicación, el termino “(poli)péptidos con actividad CHIPS” pretende incluir la proteína CHIPS original, (poli)péptidos, fragmentos, derivados y análogos que exhiben actividad CHIPS.

La molécula de ácido nucleico aislada según la invención puede ser ADN, ARN o ADNc.

Son adicionalmente descritos en este documento sondas y cebadores derivados de la molécula de ácido nucleico de la invención. Tales cebadores son oligonucleótidos o polinucleótidos de al menos 10 nucleótidos (nt) consecutivos, y más preferible de al menos unos 25 nt, aun más preferible de al menos unos 30 nt, e incluso más preferiblemente de unos 30-70 nt de la molécula de ácido nucleico de la invención. Las sondas son más largas y pueden por ejemplo ser una porción de la molécula de ácido nucleico de la invención de 50-300 nt consecutivos, o incluso tan largas como la molécula entera de ácido nucleico.

Tales oligonucleótidos o polinucleótidos son útiles como sondas de diagnóstico o como sondas en técnicas de hibridación convencional de ADN o como cebadores para la amplificación de una secuencia objetivo por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según se describe por ejemplo en Ausubel *et al.* (*supra*).

Además, la invención se refiere a un vector recombinante que comprende al menos una molécula de ácido nucleico de la invención aislada. El vector a ser utilizado puede ser seleccionado por el experto en la materia basado en su conocimiento común general y dependerá del huésped que se utiliza.

También son descritos en este documento las bacteriófagos que comprenden al menos un ácido nucleico de la invención aislado. En muchos Staphylococci positivos a CHIPS, el gen que codifica CHIPS esta ubicado en un profago y puede volverse un fago activo, por ejemplo mediante tratamiento con mitomicina según los procedimientos de aislamiento de fago estándares y publicados. Un bacteriófago es por tanto un vehículo útil para introducir en gen CHIPS en un huésped.

En adición la invención se refiere a un método para fabricar un vector recombinante, que comprende la inserción de al menos una molécula de ácido nucleico aislada de la invención dentro de un vector. Mediante la incorporación de más de una copia en el vector, o introduciendo más de un vector dentro de un huésped el nivel de expresión puede ser influenciado. Cuando es utilizada una célula huésped que comprende un gen endógeno para un correspondiente (poli)péptido con actividad CHIPS, el nivel de expresión de la misma puede ser incrementado mediante la introducción de más copias de una molécula de ácido nucleico (e.d. el gen) dentro de la célula huésped o cambiando el promotor o las regiones reguladoras.

La invención así también se refiere a huéspedes recombinantes que comprenden al menos una molécula de ácido nucleico o un vector de la invención aislado. Un número de tipos de células pueden actuar como huésped adecuado para la expresión de (poli)péptidos recombinantes con actividad CHIPS. Las células huésped incluyen la ampliamente utilizada cepa bacteriana *Escherichia coli* incluyendo, pero no limitado a, el sistema de expresión trc (Brosius *et al.*, *supra*) que permite la expresión regulada de alto nivel de promotor trc. Otras cepas bacterianas potencialmente adecuadas incluyen cepas de bacterias Gram-positivas, tales como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar proteínas heterólogas. Un proceso de producción preferido en *E. coli* es dado en el Ejemplo 6.

El (poli)péptido con actividad CHIPS puede también ser producido como una proteína recombinante utilizando un sistema de expresión adecuado empleando eucariotas inferiores tales como levaduras o células de insecto. Cepas de levaduras adecuadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Candida* o cualquier cepa de levadura capaz de expresar proteínas heterólogas. Las células de insectos usados para la expresión de la proteína recombinante incluyen el sistema *Drosophila* y el sistema Baculovirus. Alternativamente, puede ser posible producir el (poli)péptido con actividad CHIPS en un sistema de expresión mamífero que incluye varias células huésped adecuadas, incluyendo células de mono COS, células de hámster CHO, BHK o células RBL-2H3, 293 humano, 3T3, HeLa, U937, HL-60 o Jurkat, células L de ratón y otras células transformadas para cultivo *in Vitro*. Para la expresión de (poli)péptidos con actividad CHIPS en los sistemas eucarióticos, puede ser necesario modificar la proteína producida en ellos con el fin de obtener una proteína funcional. Tales modificaciones, como acoplamiento o sustituciones pueden ser logradas utilizando métodos químicos o enzimáticos conocidos. En adición, la secuencia de la molécula de ácido nucleico puede ser adaptada al uso de codones de la célula huésped.

El (poli)péptido con actividad CHIPS puede también ser expresado como un producto de animales transgénicos, ej., como un componente de la leche de vacas, cabras, cerdos, ovejas, conejos o ratones transgénicos que están caracterizados por células somáticas o germinales que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica el (poli)péptido con actividad CHIPS.

El (poli)péptido puede ser preparado mediante el cultivo de células huésped transformadas bajo condiciones de cultivo adecuadas para expresar la proteína recombinante. La proteína resultante puede ser entonces purificada del medio de cultivo o extractos de células utilizando un proceso de purificación, que comprende por ejemplo los pasos de guiar a través de una columna de cromatografía de absorción el supernatante del cultivo de la célula huésped o un líquido obtenido del mismo después de la pre-purificación; posteriormente guiando el flujo continuo de la columna de cromatografía de absorción primero sobre una columna de cromatografía de afinidad y posteriormente guiando el eluato de la columna de cromatografía de afinidad sobre una columna de ADN; o posteriormente guiando el flujo

continuo de la columna de cromatografía de absorción primero sobre una columna de ADN y posteriormente guiando el flujo continuo de la columna de ADN sobre una columna de cromatografía de absorción; guiando el flujo continuo respectivamente el eluato de la última columna de paso anterior sobre una columna de filtración en gel y columna de intercambio de Aniones, seleccionando la fracción con un peso molecular de unos 17 kDa y actividad CHIPS.

5 “Flujo continuo” se entiende en este documento que significa aquella parte del líquido cargado que tiene situada en ella los constituyentes que vienen de la columna sin tratamiento extra. Los constituyentes en este flujo continuo no se unen a la columna. “Eluato” se entiende que significa el líquido que viene de la columna después de la elución y que contiene los constituyentes del líquido cargado en la columna que se unieron a la columna y se liberaron otra vez de ella mediante la elución. En este método la columna de absorción une la mayoría de constituyentes del medio celular

10 cargado o un líquido obtenido del mismo después de la pre-purificación. La columna de afinidad une el (poli)péptido con actividad CHIPS y la Snase (Staphylococcal Nucleasa) que tiene un peso molecular similar al de la proteína CHIPS y una afinidad similar (o falta de) para la columna de afinidad respectivamente la columna de absorción. La columna de ADN une solo la Snase. Este método trabaja particularmente bien si la primera columna de cromatografía de afinidad es una llamada columna “amarilla” tinte ligando, la segunda columna de cromatografía de afinidad es la

15 llamada columna tinte ligando “verde” y la columna de ADN una columna de celulosa ADN.

En adición, otros métodos de purificación conocidos pueden utilizarse, como la filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica o cromatografía de inmunoa-

20 finidad.

Alternativamente el (poli)péptido con actividad CHIPS puede ser expresado en una forma que facilitará la purificación. Por ejemplo, puede ser etiquetado con un epitopo polihistidina (6xHis) y posteriormente purificado mediante el uso de una resina a la que se unen iones de níquel por medio de un agente quelante. El (poli)péptido con actividad CHIPS que contiene la etiqueta es eluado de la resina reduciendo el pH o compitiendo con imidazol o histidina. Tal

25 epitopo es disponible comercialmente de Invitrogen. La introducción de un sitio de corte de la proteasa, tal como para la enteroquinasa, permite la eliminación de la etiqueta de fusión para generar (poli)péptidos nativos maduros recombinantes con actividad CHIPS. Los materiales y métodos para tal sistema de expresión están disponibles comercialmente de Invitrogen, utilizando los vectores pTrcHis Xpress™ en combinación con la resina ProBound™ para el aislamiento eficiente de proteína etiquetada His y EnterokinaseMax™ como proteasa activa altamente catalítica y resina de afinidad enteroquinasa EK-Away™ para eliminar la presencia contaminante de la proteasa. Otras etiquetas conocidas por

30 los expertos en la materia que pueden ser utilizadas para facilitar la purificación incluyen, pero no están limitadas a, glutatión S transferasa (fusión GST), myc y HA.

El (poli)péptido con actividad CHIPS puede también ser producido por síntesis química conocida. Los métodos para la construcción de polipéptidos o proteínas por medios de síntesis son conocidos por los expertos en la materia. La proteína sintética, en virtud de compartir características estructurales y/o conformacionales primarias, secundarias y terciarias con el correspondiente (poli)péptido con actividad CHIPS poseerá una actividad en común con el, lo que significa propiedades CHIPS. Por tanto, tales proteínas producidas sintéticamente pueden ser empleadas como

35 sustituto biológicamente activo o inmunológico para (poli)péptido natural purificado con actividad CHIPS. La síntesis de CHIPS se ilustra adicionalmente en el Ejemplo 7.

Los (poli)péptidos con actividad CHIPS descritos en este documento también incluyen (poli)péptidos caracterizados por secuencias de amino ácidos dentro de las cuales las modificaciones son naturalmente proporcionadas o deliberadamente diseñadas. Las modificaciones en el (poli)péptido o en las secuencias de ADN puede ser hechas por

45 aquellos expertos en la materia utilizando conocidas técnicas convencionales. Las modificaciones de interés en las secuencias CHIPS activas de (poli)péptido pueden incluir la sustitución, inserción o supresión de residuos de amino ácidos seleccionados de la secuencia de codificación.

La información contenida en la proteína CHIPS, su gen y otros (poli)péptidos con actividad CHIPS y sus moléculas de ácido nucleico codificantes derivadas de los mismos puede ser utilizada para la detección de fragmentos de los

50 mismos u otros agentes que son capaces de inhibir o bloquear la unión de un (poli)péptido con actividad CHIPS a los leucocitos, y por tanto pueden actuar como inhibidores de quimiotaxis y/o unión CHIPS a su receptor putativo. Pruebas de detección apropiada pueden por ejemplo utilizar la proteína CHIPS purificada etiquetada fluorescente que se une a los neutrófilos según el análisis de citometría por flujo o fluorometría. El Ejemplo 2 describe tal ensayo. Un

55 ensayo de detección adecuado podrá alternativamente emplear receptor o dominio de receptor CHIPS purificado en un portador con una forma de proteína CHIPS como ligando. Alternativamente, puede ser empleado un ensayo para detectar la capacidad de unirse o competir con CHIPS para unirse a un anticuerpo específico anti-CHIPS (anticuerpos de cadena monoclonal, policlonal, o sencilla) por varios inmunoensayos conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitado a técnicas ELISA competitivas y no competitivas o tecnología Biosensor que emplea un chip sensor revestido

60 con ligando (CHIPS), anticuerpo o receptor CHIPS putativo (técnica de resonancia de plasma de superficie (SPR) como el BiaCore). Cualquier (poli)péptido con actividad CHIPS distinto de CHIPS puede también ser utilizado en los ensayos de detección descritos. Todos estos métodos pueden ser adaptados por Detección de Alto Rendimiento (HTS).

(Poli)péptidos asilados con actividad CHIPS pueden ser utilizados ellos mismos como inhibidores de fMLP y C5a uniéndose a sus respectivos receptores FRP y C5aR, o para diseñar inhibidores de unión de CHIPS, por la detección de inhibición competitiva. Los inhibidores de unión CHIPS (al receptor o dominios del receptor putativos CHIPS) son también útiles para el tratamiento de tales condiciones.

65

Además están descritas en este documento las moléculas que no son (poli)péptidos en sí mismas pero tienen una estructura y función similar a aquellos de los (poli)péptidos descritos en este documento. Ejemplos de tales moléculas son los peptidomiméticos. Cuando se hace referencia en esta aplicación a los (poli)péptidos, se pretende incluir también tales no (poli)péptidos que tienen similar o la misma estructura y función y como consecuencia una similar o la misma actividad biológica que los (poli)péptidos.

La actividad funcional de CHIPS, los (poli)péptidos, sus fragmentos, derivados y análogos pueden ser ensayados por varios métodos. Preferencialmente, esta actividad CHIPS es medida por su capacidad de impedir la unión de fMLP (Bodipy-fMLP) fluorescente o C5a (FITC-C5a) fluorescente a neutrófilos como se determina por citometría de flujo. El ejemplo 1 se describe tal ensayo. La actividad CHIPS es también medida por su capacidad de impedir la migración de neutrófilos hacia fMLP o C5a como se determina por el ensayo de quimiotaxis Transwell, descrito en los Ejemplos. Alternativamente, un ensayo basado en la capacidad de las quimiocinas, incluyendo fMLP y C5a, para iniciar una subida rápida y transitoria en la concentración de calcio intracelular puede ser empleado para detectar la actividad CHIPS. Varios ensayos conocidos en la materia pueden ser utilizados, incluyendo pero no limitado al uso de varias sondas fluorescentes específicas de calcio en combinación con citometría de flujo o fluorometría, o microfisiometría. Como células para la detección de actividad CHIPS por cualquiera de los métodos, pueden ser utilizados neutrófilos aislados frescos o células transfectadas con FPR o C5a, tipo salvaje o formas mutadas de esos receptores.

Los (poli)péptidos aislados con actividad CHIPS pueden ser útiles en el tratamiento, prevención o en la mejora de las condiciones inflamatorias que están implicadas en muchas enfermedades y trastornos, tales como se lista en la Tabla 1. Soporte para la utilidad terapéutica de los (poli)péptidos de la invención para el tratamiento de los enfermedades de la Tabla 1 pueden encontrarse en las siguientes referencias: Para SDRA: Demling RH (1995). Tje modern version of adult respiratory distress syndrome. *Ann. Rev. Med.* 46:193-202; y Fujishima S, Aikawa N 1995 Lesiones del tejido mediadas por neutrófilos y su modulación. *Cuidado Intensivo Med* 21:277-285; para infecciones severas (meningitis): Tunkel AR y Scheld WM (1993). Patogenia y fisiopatología de meningitis bacterial. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:118. Para lesiones tras un isquemia/reperfusión: Helier T, *et al.* (1999). La selección de un receptor C5a antagonista de las bibliotecas de fagos atenuando la respuesta inflamatoria en la enfermedad compleja inmune y isquemia/reperfusión. *J. Immunol.* 163:985-994. Para la artritis reumatoide: EdwSDRA SW y Hallet MB (1997). Viendo el bosque para los árboles: el papel olvidado de los neutrófilos en la artritis reumatoide. *Inmunología Hoy* 18: 320-324; y Pillinger MH, Abramson SB (1995). El neutrófilo en la artritis reumatoide. *Rheum. Dis. Clin. Norte Am.* 1995 21: 691-714. Para el infarto del miocardio: Byrne JG, Smith WJ, Murphy MP, Couper GS, Appleyard RF, Cohn LH (1992). Prevención completa de aturdimiento miocárdico, contractura, bajo reflujo, y el edema después del trasplante del corazón mediante el bloqueo las moléculas de adhesión de neutrófilos durante la reperfusión. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 104:1589-96. Para COPD: Cox G (1998). El papel de los neutrófilos en la inflamación. *Can. Respir. J.* 5 Suppl A:37A-40A; y Hiemstra PS, van Wetering S, Stolk J (1998). Neutrófilos serina proteinasas y defensinas en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica: efectos sobre el epitelio pulmonar. *Eur. Respir. J.* 12:1200-1208. Para el accidente cerebrovascular: Barone FC, Feuerstein GZ (1999). Mediadores inflamatorios y el accidente cerebrovascular: nuevas oportunidades para nuevas terapias. *J. Cereb. Flujo Sanguíneo Metab.* 19:819-834; y Jean WC, Spellman SR, Nussbaum ES, Low WC (1998). Reperfusión después de la isquemia cerebral local: el de la inflamación y el horizonte terapéutico. *Neurocirugía* 43:1382-1396. Para la meningitis: Tuomanen EI (1996). Mecanismos celulares y moleculares de la meningitis neumocócica. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 797:42-52.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 382 422 T3

TABLA 1

Condiciones inflamatorias como objetivos para CHIPS			
SISTEMA	ENFERMEDAD	SISTEMA (cont)	ENFERM. (cont)
Cardio-vascular	Arterioesclerosis	Genitourinario	Infección del tracto urinario
	Sepsis		Glomerulonefritis
	Choque isquémico		Infección por <u>Trichomonas vaginalis</u>
	Bypass cardiopulmonar		Endometriosis
	Cirugía de la aorta	Articulaciones	Artritis reumatoide
	Transplante de corazón		Artritis reactiva aguda
	Infarto de miocardio		Gota
Nervioso central	Meningitis bacteriana	respiratorias	SDRA
	Meningitis viral		COVID
	Esclerosis múltiple		Fibrosis pulmonar idiopática
	Ictus		Fibrosis quística
	Enfermedad de Alzheimer		Asma
	Tumor cerebral		Emphema pleural
Gastro-intestinal	Pancreatitis		Fiebre de humos metálicos
	Colitis ulcerosa		Bronquitis crónica
	Hepatitis alcohólica		Hipersensibilidad neumonía
	Hepatitis viral		Infección por <u>Mycobacterium tuber</u>
	Gastritis <u>Helicobacter</u>		Infección viral del tracto

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 382 422 T3

	<u>pylori</u>		respiratorio
	Carcinoma gástrico		Rinitis alérgica
5	Carcinoma hepatocelular		Sinusitis
	Peritonitis		Carcinoma broncogenico
10	Piel	Varios	Pariodentitis
	Dermatitis de contacto		Infección por el VIH
15	Dermatitis atópica		Leucemia crónica linfatica
20	Linfoma cutáneo de células T		Rechazo agudo de transplante
	Quemaduras		Glomerulonefritis
25			Congelación
			Lesión por esfuerzo repetitivo
30			

Adicionalmente se describen en este documento (poli)péptidos con actividad CHIPS para su uso en diagnósticos, profilaxis o terapias, en particular para su uso en el tratamiento de las reacciones de inflamación aguda y crónica y la infección del VIH, más en particular para su uso en el tratamiento de Síndrome de Distrés Respiratorio del Adulto (SDRA), choque isquémico, lesión traumática del cerebro, infecciones severas, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, cirugía vascular, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD), artritis reumatoide, dermatosis, esclerosis múltiple, enfermedad del Alzheimer, arteriosclerosis, lesión por esfuerzo repetitivo (RSI), rechazo agudo de transplante, quemaduras, artritis reactiva aguda, pancreatitis, vasculitis, glomerulonefritis, gota, congelación y meningitis.

También está descrito en este documento el uso de los (poli)péptidos con actividad CHIPS para la fabricación de una preparación para diagnósticos, profilaxis o terapia, en particular para el tratamiento de reacciones de inflamación aguda y crónica e infecciones de VIH, más en particular para el tratamiento de las indicaciones listadas anteriormente.

También se describen en este documento composiciones terapéuticas que comprenden un excipiente adecuado y el (poli)péptido con actividad CHIPS de la invención. Tal composición puede ser utilizada para los tratamientos especificados anteriormente.

También se describe aquí el uso de moléculas de ácido nucleico de la invención, opcionalmente incorporadas en un constructo mayor, para varios propósitos, tales como el aumento de anticuerpos de ellas, modulando la actividad CHIPS o en una preparación terapéutica.

También se describen aquí moléculas de ácido nucleico y la secuencia de aminoácido codificada por las moléculas de ácido nucleico que pueden ser identificadas por la llamada "clonación computarizada". Más específicamente, esta técnica comprende usar (1) la secuencia de ácido nucleico representada en la figura 4, o fragmentos, derivados y análogos de la misma, o (2) la secuencia de ácido nucleico representada en la figura 5, o fragmentos, derivados y análogos de la misma como un requerimiento para la detección de secuencias de ácido nucleico o bases de datos de secuencias de ácido nucleico, o secuencias de proteínas o bases de datos de secuencias de proteína, utilizando algoritmos de búsqueda que pueden identificar regiones con homología. Tales algoritmos son conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, búsquedas BLAST (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). Las bases de datos de secuencias que pueden ser investigadas incluye, pero no están limitados a, la base de datos Genbank™ y la base de datos Swissport™. Cuando se utiliza una búsqueda BLAST o modificaciones de la misma, generalmente se pueden identificar sujetos que muestran homología. La identificación está basada en el valor del Resultado o la Probabilidad de Suma más Pequeña P(N). Homólogos de la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de (poli)péptido CHIPS se definen por un Resultado que es al menos 200, preferentemente al menos 400, más preferentemente al menos 800, más preferiblemente al menos 1600. Alternativamente, el valor P(N) puede ser utilizado para la identificación

de secuencias homologas. Los homólogos de la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de (poli)péptido CHIPS se definen por un valor $P(N)$ que es más pequeño que $1e-3$, preferentemente más pequeña que $1e-6$, más preferentemente más pequeña que $1e-12$, incluso más preferentemente más pequeña que $1e-24$, más preferiblemente más pequeña que $1e-48$.

5

También se describen aquí anticuerpos o fragmentos biológicamente activos de los mismos dirigidos específicamente al (poli)péptido de la invención y a moléculas basadas en CHIPS y bloqueantes de receptor CHIPS. Tales moléculas basadas en CHIPS y bloqueantes de receptor CHIPS, y anticuerpos o fragmentos biológicamente activos y pueden ser utilizados quiméricos, cadenas simples, y bibliotecas de expresión para neutralizar la actividad de la proteína CHIPS o (poli)péptidos relacionados en profilaxis o terapia, o pueden ser utilizados para propósitos de diagnóstico para unir CHIPS o (poli)péptidos relacionados. Tales anticuerpos y moléculas basadas en CHIPS y bloqueantes de receptor CHIPS son por ejemplo útiles para el tratamiento de la infección por *Staphylococcus*. Además se describen aquí composiciones terapéuticas que comprenden un excipiente adecuado y uno o más de estos anticuerpos y/o fragmentos biológicamente activos de los mismos.

15

“Moléculas basadas en CHIPS y bloqueantes de receptor CHIPS” son moléculas que compiten con CHIPS en un ensayo de unión CHIPS como se describe en el Ejemplo 8. Tales “moléculas basadas en CHIPS y bloqueantes de receptor CHIPS” pueden por ejemplo ser moléculas que tienen la misma composición de aminoácido y secuencia de aminoácido que CHIPS, pero no la secuencia completa. Tales moléculas pueden ser simples fragmentos de CHIPS, o pueden consistir de fragmentos múltiples de CHIPS, todos aún con actividad CHIPS. Sin embargo, todas las otras moléculas que cumplen el requerimiento funcional de competir con CHIPS en un ensayo de unión CHIPS se incluyen también.

20

Las moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención pueden además ser utilizadas para terapia génica. La molécula de ácido nucleico puede ser introducida en el sitio de inflamación para actuar localmente o en un sitio distante. La terapia génica es a través de vectores virales, tales como, pero no limitados a, vectores adenovirales, vectores virales adeno-asociados o vectores lentivirales. Alternativamente, vectores no virales, tales como aquellos basados en liposomas o polímeros pueden ser utilizados. Las estrategias génicas terapéuticas están basadas en (1) terapia génica *in vivo*, donde las moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención son introducidas en células diana *in vivo*, (2) terapia génica *ex vivo*, donde las moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención son introducidas en células dianas *ex vivo*, seguido por la administración de las células transducidas, o una subpoblación de las células transducidas, en un individuo.

25

30

También se describe aquí un método para el tratamiento de un sujeto que sufre de inflamación mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un (poli)péptido como se describe en este documento y un método para tratar terapéuticamente por gen un sujeto que sufre de inflamación mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de ácido nucleico, así como un método para el tratamiento de un sujeto que sufre de infección por *Staphylococcus* mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo y/o fragmento biológicamente activo del mismo.

40

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser utilizadas en un método para aislar de un organismo un gen que codifica una proteína con actividad CHIPS, cuyo método comprende la detección de una biblioteca genómica o de ADNc de tal organismo con una sonda basada en la molécula de ácido nucleico, y el aislamiento de los clones positivos.

45

Adicionalmente se describe aquí un micro-organismo que acoge una o más moléculas de ácido nucleico de la invención para uso como un medicamento para el tratamiento de reacciones de inflamación aguda y crónica e infección de VIH, en particular para el tratamiento del Síndrome de Destrés Respiratorio del Adulto (SDRA), choque isquémico, lesión traumática del cerebro, infecciones severas, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, cirugía vascular, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD), artritis reumatoide, dermatosis, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, arterioesclerosis, lesión por esfuerzo repetitivo (RSI), rechazo agudo de trasplante, quemaduras, artritis reactiva aguda, pancreatitis, vasculitis, glomerulonefritis, gota, congelación y meningitis.

55

La invención además se refiere a una prueba de diagnóstico de PRC para la detección de un paciente infectado con *Staphylococcus aureus* en presencia del gen CHIPS. CHIPS es un factor importante de virulencia debida a estafilococos, de modo que los pacientes con *Staphylococci* que contienen CHIPS están en mayor riesgo de enfermedades invasivas y pueden necesitar tratamiento diferente o adicional.

60

Todas las moléculas descritas en este documento, e.d. moléculas de ácido nucleico, (poli)péptidos, no (poli)péptidos, fragmentos, derivados y análogos, pueden encontrar otras aplicaciones. Tales aplicaciones incluyen, pero no se limitan a:

65

- Aislamiento de factores que pueden unir las moléculas mencionadas anteriormente. Ejemplos de tales factores son receptores y proteínas. Tal aislamiento puede por instancia ser realizado utilizando el sistema de levadura doble híbrido o utilizando moléculas etiquetadas como cebo para pesca.
- Diseño de péptidos y peptidomiméticos.

ES 2 382 422 T3

- Haciendo bibliotecas de presentación de fagos, lo que puede a su vez ser utilizado para la determinación de dominios activos, equivalentes funcionales etc.
- Identificación de vías de transducción de señales que son activadas o inactivadas por CHIPS y las moléculas de la invención.
- Ensayo para la determinación de la actividad biológica CHIPS (inhibición de la quimiotaxis o la expresión del receptor de quimioquinas).

Todas las moléculas descritas en este documento pueden ser etiquetadas de cualquier manera. Ejemplos de etiquetado incluyen pero no se limitan a fluorescencia, biotina, etiquetado radioactivo etc. Tales moléculas etiquetadas pueden ser utilizadas para la detección de compuestos que se asemejan o se superponen con la actividad biológica de CHIPS, así como para la identificación de sitios de unión, *in vivo* e *in Vitro*, y para el rastreo de proteína CHIPS o ácido nucleico en un organismo.

Esta claro que cuando se hace referencia aquí a un (poli)péptido con una particular secuencia de aminoácido, se pretende que también abarque los (poli)péptidos que contienen uno o más aminoácidos que son modificados químicamente de un modo obvio para un experto en la materia, siempre que tal modificación no elimina la actividad CHIPS.

Las realizaciones más preferidas están listadas en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los ejemplos que siguen y que de ninguna manera se pretende que sean limitativos de la presente invención. En esta descripción y ejemplos se hace referencia a las siguientes figuras y tablas:

Figura 1 muestra la actividad CHIPS del eluato de la columna Mono Q.

Figura 2 muestra la SDS-PAGE teñida de Azul Coomassie de CHIPS purificado después del paso final de cromatografía Mono Q.

Figura 3 muestra la unión dependiente de concentración de CHIPS-FITC a las diferentes poblaciones de leucocitos.

Figura 4 muestra la secuencia de gen *chp* a partir de *S. aureus* Newman. La secuencia Shine Dalgarno (AGGAGA) y el marco *chp* de lectura abierta (ORF) están subrayados. Los nucleótidos que codifican la proteína madura se indican con una doble línea. Nucleótidos divergentes en la secuencia de *S. aureus* 1690 se indican sobre la secuencia.

Figura 5 muestra la secuencia de aminoácido deducida a partir del gen *chp* *S. aureus* Newman. La región que se adapta a los aminoácidos N-terminal 35 de CHIPS es subrayada. Aminoácidos divergentes en la proteína de *S. aureus* 1690 se indican sobre la secuencia.

Figura 6 muestra la detección del gen *chp* en los genomas de cepas de *S. aureus*.

Figura 7 muestra actividad CHIPS en los supernatantes de cepas de *S. aureus*.

Figura 8 muestra la distribución del gen *chp* en los genomas de varias cepas clínicas de *S. aureus*.

Figura 9 muestra dos curvas de respuesta de dosis de anticuerpos de conejo anti-CHIPS uniéndose a péptidos derivados de CHIPS de aminoácidos 1 hasta 15 (figura 9A) y CHIPS purificado (figura 9B) según determinado mediante ELISA.

Figura 10 muestra la inhibición dependiente de concentración de migración de neutrófilo hacia fMLP por CHIPS purificado, expresado como porcentaje de células tratadas con tampón. Las células se incubaron con varias concentraciones CHIPS durante 30 minutos a temperatura ambiente y añadidas al compartimiento superior del contenedor Transwell. La migración hacia 1×10^{-8} M fMLP se determinó después de 60 minutos de incubación a 37°C.

Figura 11 es una imagen representativa de un SDS-PAGE que muestra el CHIPS recombinante purificado final (rCHIPS) obtenido de un lisado de *E. coli* después de cromatografía de afinidad sobre una columna de Níquel y la división de la etiqueta Histina por Enteroquinasa.

Figura 12 muestra la inhibición dependiente de concentración de CHIPS recombinante (rCHIPS) en la expresión del receptor para fMLP (FPR) y C5a (C5aR) en neutrófilos.

Figura 13 muestra el deterioro dependiente de concentración de la liberación de calcio intracelular libre inducido por fMLP y C5a en neutrófilos.

Figura 14 muestra la inhibición de unión de CHIPS-FITC dependiente de concentración mediante el CHIPS recombinante completo y el CHIPS⁴⁻¹²¹ recombinante mutante.

La Tabla 1 muestra condiciones inflamatorias que pueden ser tratadas con los (poli)péptidos y no (poli)péptidos de la invención; y

La Tabla 2 muestra la unión en ELISA de varios clones seleccionados de anticuerpos monoclonales derivados de un ratón inmunizado con CHIPS. La unión es para purificar CHIPS y los anticuerpos monoclonales de ratón reactivos se detectan con un anticuerpo anti-ratón HRPO-acoplado.

Ejemplos

Ejemplo 1

Purificación de la proteína CHIPS a partir de S. aureus supernatante

Material y método

1.1 Aislamiento de la proteína

El *Staphylococcus aureus* 1690 (un aislamiento clínico, Universidad de Utrecht Centro Medico (UMC Utrecht)) o el *Staphylococcus aureus* Newman (un regalo de Dr Foster, Dublin) se cultiva durante la noche en un medio IMDM (Gibco) y posteriormente se diluye 1:40 en IMDM fresco durante 7 horas de cultivo a 37°C. Después de la granulación de la bacteria el *S. aureus* supernatante (denominado como SaS) es recolectado, filtrado sobre un filtro de 0.2 m y utilizado inmediatamente (Veldkamp *et al.*, *Inflamación* 21. 541-551 (1997)). Una cantidad de 5 litros de SaS es llevada sobre tres columnas (25 ml) acopladas en tándem. Estas tres columnas son sucesivamente un “Reactivo Amarillo 861” tinte ligando reticulado 4% columna de agarosa perlada (Sigma), una Celulosa de ADN (Farmacia) y un “Reactivo Verde” 19 tinte ligando reticulado 4% columna de agarosa perlada (Sigma).

Después del lavado con PBS la columna verde (Reactivo Verde 19) es eluido con 2 M NaCl y los segundos 50 ml, que contienen actividad CHIPS, son mezclados. PMSF (1 mM) es agregado y el eluido se dializa en PBS durante 18 horas. La muestra es concentrada a un volumen de \pm 10 ml en una bolsa de diálisis empapada en polietilenglicol. El material concentrado es separado en una columna de filtración en gel Pharmacia Superdex-200, tras lo cual las fracciones activas (4 ml volumen) se agrupan, se tratan con PMSF (1 mM) y se dializan en 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) durante 18 horas. Las fracciones activas agrupadas se cargan en una columna de intercambio de aniones Mono Q (Pharmacia) que es eluido con un gradiente de 10 mM Tris-HCl de tampón que va de 0 a 1M NaCl. Las fracciones activas (1 ml volumen) se agrupan y se utilizan como la preparación final de CHIPS purificado. El contenido de proteína es determinado con un ensayo Pierce Micro-BCA y CHIPS es almacenado a -20°C en pequeñas alícuotas. El material aislado final es analizado para pureza en un 12.5% SDS-PAGE (Mini-Protean II; BioRad) después de la tinción con Coomassie Blue. La proteína CHIPS aparece como una banda simple con un peso molecular aparente de 17 kDa. Todas las fracciones se detectan para actividad CHIPS por su capacidad de inhibir la unión de fMLP fluorescente-etiquetado a neutrófilos aislados como se mide por citometría de flujo.

1.2 Unión de fMLP y C5a s granulocitos

Los granulocitos son aislados de sangre heparinizada de voluntarios sanos por medio de un gradiente de Ficoll-Histopaque según el método estándar (Troelstra *et al.*, *J. Leukocyte Biol.* 61, 173-178 (1997)). El resto de los eritrocitos en la fracción granulocito son lisados con agua estéril (durante 30 seg.) y lavado después de la recuperación de la isotonicidad. Las células son finalmente resuspendidas en RPMI (Gibco) con 0.05% de Albúmina Sérica Humana (RPMI/HSA). En tubos Falcon 50 l de células (5×10^6 células/ml) son incubadas con 50 l de material que contiene CHIPS (SaS, CHIPS purificado o fracciones de columna) durante 30 minutos a 37°C. Las células son colocadas en hielo y lavadas una vez con RPMI/HSA (a 4°C) y resuspendidas en 50 l de medio fresco. 5 l de fMLP BODIPY etiquetado (concentración final 0.1 M; Sondas Moleculares) o FITC etiquetado C5a (concentración final 1 M; C5a recombinante de Sigma, etiquetado con FITC como se describe en el ejemplo 2.1 para CHIPS) es entonces agregado y la muestra es incubada durante 60 minutos en hielo. Después del lavado se analiza el fMLP o C5a fluorescente que une a los granulocitos con un citómetro de flujo (FAVCCan; Becton Dickinson). El valor de fluorescencia media de 5000 granulocitos es calculado con el software Lysis II.

Resultados

Figura 1 muestra el perfil de elución (OD_{280}) de la actividad CHIPS del eluido de la columna Mono Q. Las fracciones de volumen entre 39 y 41 ml muestran la actividad CHIPS más intensa. Figura 2 muestra el SDS-PAGE teñido por Coomassie Blue de CHIPS purificado después del paso de cromatografía Mono Q final.

Ejemplo 2

*Unión específica de CHIPS a neutrófilos y monocitos*5 *Material y método*2.1 *Etiquetado FITC de proteína CHIPS purificada*

10 CHIPS purificado (500 g/ml de proteína) es incubada con 1/10 de volumen de 1 mg/ml FITC (Isotiocianato de Fluoresceína, Isómero I; Sigma) en un buffer de 1 M de carbonato de sodio pH 9.6 durante 1 hora a temperatura ambiente. CHIPS etiquetado FITC es separado del FITC libre pasando la mezcla por una columna de desalación (Pharmacia, Fast Desalting HR 10/10) y supervisando el eluido por OD₂₈₀ y fluorescencia por un fluorómetro acoplado en línea (Perkin Elmer). Fracciones con alto OD₂₈₀ y fluorescencia se combinaron y analizaron para el contenido de proteína con el ensayo de la proteína Micro BCA (Pierce). CHIPS-FITC es almacenado en pequeñas alícuotas a -20°C.

15

2.2 *Unión de CHIPS-FITC a leucocitos*

20 La unión específica de CHIPS-FITC a los leucocitos es determinado por citometría de flujo. Los neutrófilos purificados y las células mononucleares (que consisten de monocitos y linfocitos) son aislados de la sangre heparinizada de voluntarios sanos como se describe (Troelstra *et al.*, Infect. Immun. 65: 2272-2277 (1997)). Las células aisladas son remezcladas para obtener una proporción de células que imita la situación en la sangre. Los glóbulos rojos humanos se obtienen mediante el lavado de una alícuota pequeña de sangre entera tres veces con PBS. La concentración de glóbulos rojos es determinada por espectrofotometría.

25

30 En tubos Falcon 50 l de leucocitos o glóbulos rojos (5 x 10⁶ células/ml) son incubados con 5 l CHIPS-FITC a varias concentraciones durante 30 minutos en hielo. Las células se lavan una vez con medio (RPMI que contiene 0.05% HSA) y resuspendidas en 150 l de medio fresco. La unión de CHIPS-FITC a los leucocitos es medida por citometría de flujo (FACScan; Becton Dickinson). La asociación con diversas subpoblaciones es analizado por bloqueo electrónico selectivo en parámetros de dispersión hacia delante (FSC) y lateral (SSC) en el software LysisII (BD). El valor de fluorescencia promedio de la población celular seleccionada es calculado con el software.

35

Resultados

35

Figura 3 muestra la unión dependiente de concentración de CHIPS-FITC a las diversas poblaciones de leucocitos. Se puede ver que CHIPS-FITC se une más eficientemente a los neutrófilos, seguido por los monocitos. CHIPS-FITC no se une a los glóbulos rojos y ligeramente a los linfocitos, pero solo a una subpoblación. La unión de CHIPS-FITC a los neutrófilos es específica porque la adición de un exceso de 10 veces de CHIPS no fluorescente etiquetado inhibe completamente la asociación con CHIPS-FITC a las células.

40

Ejemplo 3

45 *Secuencia, clonación, y expresión del gen que codifica CHIPS (chp) de Staphylococcus aureus**Material y método*3.1 *Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento*

50

55 *Staphylococcus aureus* Newman, RN4220, y COL son cepas de laboratorio comúnmente utilizadas. *S. aureus* 1690 es una cepa clínica, aislada de un paciente con bacteriemia (K. E. Veldkamp *et al.*, Inflamación, 21:541-551 (1997)). *Escherichia coli* DH5 se utilizo como un huésped clonante (F.M. Ausubel *et al.*, Protocolos Recientes en Biología Molecular, Jhon Wiley e Hijos, Inc., New York, N.Y. (1990)). Plásmido pRB474 es un vector de transporte para *E. coli* y staphylococci que contiene el promotor *vegII* de *Bacillus subtilis* que permite la expresión de genes clonados dentro del sitio de clonación múltiple de pRB474. pRB474 es un derivado de pRB374 (R. Brückner, Gen, 122:187-192) en la cual el gen de resistencia a la neomicina ha sido reemplazado por un gen de resistencia al cloranfenicol. Todas las cepas se cultivaron en caldo BM (1% triptona, 0.5% de extracto de levadura, 0.5% NaCl, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% glucosa) a 37°C a menos que se indique lo contrario.

60

3.2 *Análisis de Secuencia*

65 El ADN se secuencio mediante secuenciación cíclica en un secuenciador de ADN 4000 L (LI-COR Inc., Lincoln, Neb., USA) utilizando el kit Thermo SequenaseTM de secuenciación cíclica de promotor etiquetado fluorescente (Amersham, Little Chalfont, UK). Se usaron promotores adecuados para secuenciar ADN genómico directamente el cual fue aislada según J. Mamur (J. Mol. Biol., 3:208-218 (1996)). El método de secuencia ha sido descrito brevemente en Peschel *et al.* (J. Biol. Chem., 274:8405-8410 (1999)). Para realizar búsquedas de similitud de secuencias, fue

utilizado el programa BLAST 2.0 con la base de datos de la proteína no redundante de NCBI (Bethesda, Md., USA) Los alineamientos de secuencia se llevaron a cabo utilizando el algoritmo Higgins-Sharp del programa MacDNASIS Pro (Hitachi Software Engineering, San Bruno, Calif. USA).

5 Previamente, los primeros 35 aminoácidos de CHIPS se determinaron por secuenciación N-terminal de la proteína purificada. El ADN de *S. aureus* es muy rico en nucleótidos A y T mientras que los nucleótidos G y C son raros (solo un 30% de las bases totales). Por tanto, para la mayoría de aminoácidos, son preferidos los codones más ricos en A y T. Según esta regla, una secuencia promotora se derivó de aminoácidos 15-24 (GAAAAAGAAAAAGCATATAAA GAA (SEC ID NO 1)). El cebador se utilizó para la secuencia de ADN genómico directamente de *S. aureus* Newman
10 rindiendo una secuencia de varios cientos de pares de bases. Un nuevo cebador se derivó de esta secuencia para leer hacia el sitio del primer cebador. La secuencia de ADN combinada contiene el sitio de unión del primer cebador con dos diferencias (G en vez de A en la posición 3 y T en vez de A en la posición 15) (Figura 4). Ello codificó un marco de lectura abierta de 450 bp precedida por una razonable secuencia Shine Dalgarno para iniciación de traslación (J. Shine y L. Dalgarno, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71:1342-1346 (1974)) y seguida por tres codones de parada. El gen fue nombrado *chp*; codifica una proteína putativa de 149 aminoácidos sin similitudes con cualquier proteína en la base
15 de datos. Los 28 aminoácidos N-terminal parecen formar una señal péptido para secreción a través de la membrana citoplasmática (3 residuos de carga positiva seguido por una región sin carga de 22 aminoácidos y un motivo consenso ALA-X-ALA para la ruptura de la señal paptidasa 1; Figura 5) (G. von Heijne, Nucl. Ácidos Res. 14:4683-4690 (1986)). La señal péptido es seguido por una región que coincide casi perfectamente con los 35 aminoácidos N-terminal de CHIPS. La única excepción es una serina en la posición 33 de la proteína madura deducida en vez de un residuo de asparagina predicho por secuenciación N-terminal. La proteína madura deducida tiene un tamaño de 121 aminoácidos y 14.1 kDa y un punto isoeléctrico de 9.32. Por lo tanto cumple todos los requisitos para la proteína CHIPS. Utilizando los mismos cebadores, el gen *chp* de *S. aureus* 1690 fue secuenciado. Los dos genes fueron casi idénticos con 5 desviaciones. A nivel de secuencia de aminoácido, solo una posición fue cambiada (Figura 4 y 5).

25

3.3 Clonación y expresión del gen *chp*

El gen *chp* de *S. aureus* Newman se amplificó mediante PCR utilizando cebadores cuyas secuencias se modificó
30 para introducir sitios de restricción permitiendo la clonación de *chp* en el plásmido de expresión pRB474. El plásmido pPr4-*chp* resultante contiene la región codificada de *chp* 19 bp hacia arriba del codón de inicio que contiene la secuencia Shine Dalgarno y 104 bp hacia abajo del primer codón de parada. El fragmento se insertó en la orientación apropiada permitiendo la expresión del gen mediante el promotor *vegII* y la identidad del fragmento se verificó mediante análisis de secuencia. El plásmido pPr4-*chp* se transfirió a la cepa *S. aureus* de restricción negativa mediante
35 electroporación (J. Augustin y F. Götz, FEMS Microbiol. Lett. 66:203-208 (1990)), fue aislado de un clon positivo, y electroporado dentro de *S. aureus* COL (adhesión TIGR no. 1280). La identidad del plásmido se verificó por análisis de restricción de fragmento y secuenciación del inserto.

El gen *chp* no estaba contenido en la secuencia del genoma parcialmente disponible de *S. aureus* COL (TIGR
40 accession no. 1280). Mediante análisis PCR se demostró, que el gen carece de hecho de *S. aureus* COL mientras que *S. aureus* Newman y 1690 fueron positivos (Figura 6). Además, *S. aureus* COL fue negativo en el ensayo de actividad CHIPS (Figura 7). El gen *chp* de *S. aureus* Newman fue clonado en plásmido pPr4-*chp*, el cual permite la expresión de genes clonados por un promotor plásmido codificado. La transformación de *S. aureus* COL con el plásmido hizo la
45 cepa positiva en el ensayo CHIPS (Figura 7), probando que el gen *chp* codifica la proteína CHIPS.

3.4 Detección del gen *chp* mediante PCR

La ausencia o presencia del gen *chp* en diversas cepas *S. aureus* se determinó por PCR utilizando extracto de
50 células crudas como una fuente de calibración. Una colonia bacteriana de una placa de agar fresco fue resuspendida en 1.5 ml de solución salina, sedimentada y resuspendida en 100 l de una solución de mezcla de lisis que contiene 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.1 mg lisostafina/ml, y 0.1 mg acromopeptidasa/ml. Las muestras se incubaron a 37°C durante 30 minutos y luego se centrifugaron. El supernatante limpio se calentó a 100°C durante 5 minutos y posteriormente se diluyó por adición de 400 l TE tampón (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8). 1 l de los extractos
55 celulares se aplicó a las reacciones PCR utilizando los cebadores *chp* específicos *chp*-5' (GAAAAAGAAATTAG CAACAACAG (SEC ID NO 2)) y *chp*-3' (CATAAGATGATTAGACTCTCC (SEC ID NO 3)). La amplificación se llevó a cabo mediante 35 ciclos compuestos de 1 minuto a 90°C, 1 minuto a 55°C, y 1 minuto a 72°C. El producto PCR resultante comprende 90.4% del gen *chp* a partir de 2 bp hacia arriba del codón de inicio y terminando 41 bp hacia
60 abajo del primer codón de parada. Los productos PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa. Todas las técnicas de secuencia, PCR, y ADN recombinante se llevaron a cabo según los procedimientos estándares (F.M. Ausubel *et al.*, Protocolos Recientes en Biología Molecular, Jhon Wiley E hijos, Inc., Nueva York, N.Y. (1990)).

3.5 Ensayo para actividad CHIPS

65 Las cepas *S. aureus* se analizaron para actividad CHIPS en un ensayo para unión de fMLP etiquetado fluorescente a neutrófilos humanos. Las cepas se cultivaron en un medio IMDM (Life Technologies, Paisley, UK), durante 24 horas y los supernatantes cultivados se analizaron y probaron como se describe en el ejemplo 1.2.

Resultados

Figura 4 muestra la secuencia del gen *chp* de *S. aureus* Newman. La secuencia Shine Dalgarno (AGGAGA) y el *chp* de marco de lectura abierto (ORF) son subrayados. Los nucleótidos que codifican la proteína madura están indicados por una doble línea. Los nucleótidos divergentes en la secuencia de *S. aureus* 1690 se indican sobre la secuencia.

Figura 5 muestra la secuencia de aminoácido deducida del gen *chp* *S. aureus* Newman. La región que se empareja con los 35 aminoácidos N-terminal de CHIPS es subrayada. Aminoácidos divergentes en la proteína *S. aureus* 1690 se indican sobre la secuencia.

Figura 6 muestra la detección del gen *chp* en los genomas de las cepas *S. aureus*. Los productos PCR obtenidos con cebadores *chp* específicos se separaron en un gel de agarosa. Vías 1 y 2, *S. aureus* Newman; vías 3 y 4, *S. aureus* COL; vías 5 y 6, *S. aureus* 1690. Las siguientes bacterias resultaron ser negativas para presencia del gen *chp* según lo determinado por PCR: *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *staphylococcus hominis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri* y *Escherichia coli*.

Figura 7 muestra actividad CHIPS en los supernatantes de las cepas *S. aureus*. Diversas concentraciones de cultivos de supernatantes de *S. aureus* 1690 (cuadrados), COL de tipo salvaje (círculos abiertos) y COL con plásmido pPr4-*chp* (círculos sólidos) se ensayaron para inhibición de unión de fMLP a neutrófilos humanos. La fluorescencia de fondo fue restada y los valores dados como % de las muestras de control (incubación sin cultivo de supernatantes).

Figura 8 muestra la distribución del gen *chp* en los genomas de diversas cepas clínicas *S. aureus*. Las bacterias son detectadas por PCR con cebadores *chp* específicos y evaluados por la presencia de la banda 400 bp específica en un gel de agarosa. Las cepas *S. aureus* son agrupadas en focos de aislamiento de los pacientes. Lab = Laboratorio de cepas; Otros = cepas de otros fluidos corporales; CAPD = cultivos de Diálisis Peritoneal Crónica Ambulatoria; Sangre = cultivos de sangre; Herida = infecciones de heridas; MRSA = Cepas *S. aureus* de Múltiple Resistencia.

Ejemplo 4

Anticuerpos específicos para CHIPS

Material y método

4.1 Inmunización

Los anticuerpos específicos para la proteína CHIPS pueden ser producidos utilizando proteína purificada natural o recombinante o péptidos sintéticos derivados de secuencia, como antígeno. Ambos anticuerpos policlonales y monoclonales han sido producidos utilizando técnicas estándar (como se describe en Harlow y Lane (1988), Anticuerpos, Un Manual de Laboratorio, Cold Spring Harbor Laboratory Press; y Erich, *et al* (1989), J. Immunol. 143: 4053-4060). Sobre la base de los primeros 15 aminoácidos, un péptido sintético fue hecho según con química estándar Fmoc como se describe en De Haas *et al.*, J. Immunol. 161:3607-3615. El péptido se acopló a Hemocianina de Lapa Californiana según las instrucciones del fabricante (Pierce) y se inmunizó subcutáneamente con Adyuvante Completo de Freund, seguido por dos inyecciones de refuerzo con adyuvante incompleto de Freund.

Las inmunoglobinas de sueros de animales inmunizados o supernatantes de cultivo celular de hibridoma son aislados por cromatografía de afinidad utilizando resinas comerciales que contienen Proteína A, Proteína G o recombinantes de los mismos (Pharmacia).

4.2 ELISA

Antisueros y anticuerpos purificados (IgG) son examinados para detectar la reactividad con proteína CHIPS purificada o péptido sintético derivado por ELISA. Para ello el antígeno se recubre sobre una placa de microtitulación (Nunc "Maxisorb") a una concentración de 1 a 3 g/ml en un 0.1 M de tampón de carbonato pH 9.6 durante 18 horas a 4°C. Después del lavado, el plástico no ocupado es bloqueado con 4% BSA en PBS/Tween 20 (0.05%) durante 1 hora a 37°C. Se hacen diluciones en serie de los anticuerpos en PBS/Tween conteniendo 2% BSA y se incuban durante 1 hora a 37°C. Los anticuerpos ligados son incubados con un anticuerpo secundario etiquetado peroxidasa diluido 1/5000, ya sea IgG de cabra anti-conejo para anticuerpos policlonales o IgG de cabra anti-ratón para anticuerpos monoclonales (ambos de Southern Biotechnology Associates, Inc.), durante 1 hora a 37°C. Las reacciones son desarrolladas con TMB como sustrato y la Densidad Óptica (OD) se leyó a 450 nm.

Resultados

Figura 9 muestra la unión específica de IgG policlonales de un conejo inmunizado con un péptido sintético que comprende los primeros 15 aminoácidos N-terminal de CHIPS (péptido anti-CHIPS). Una elevada OD₄₅₀ es mostrada para el péptido anti-CHIPS de conejo con el péptido (figura 9A) así como la proteína CHIPS purificada (figura 9B)

ES 2 382 422 T3

revestida a los pocillos. El efecto es dependiente de concentración y es ya significativo con una concentración mínima de 30 ng/ml IgG. Una combinación no inmunizada de IgG de conejo normal da alguna unión de fondo, pero solo a concentraciones elevadas de anticuerpos, especialmente cuando CHIPS purificado es recubierto sobre la placa ELISA.

5 La Tabla 2 muestra la unión específica de clones hibridoma seleccionados derivados de ratones inmunizados con proteína CHIPS purificada.

Nombre de clon	OD ₄₅₀
Fondo	0.056
25-1	0.973
25-2	0.985
25-3	1.286
29-1	1.847
29-2	1.433
29-3	1.564
29-4	2.123

Ejemplo 5

30 *Ensayo de quimiotaxis*

La actividad CHIPS de (poli)péptidos y no-(poli)péptidos de la invención puede por ejemplo ser determinada con el siguiente ensayo.

35 Con el fin de determinar la migración directa se hace uso por ejemplo de un sistema Transwell (Costar) que consiste de un compartimiento superior y de un compartimiento inferior separados por una membrana de policarbonato de 3 m. Los granulocitos son etiquetados con BCECF (2-carboxietilo-5-(y-6-) carboxifluoresceína; Sondas Moleculares), una etiqueta fluorescente que entra en el citoplasma de las células. Las células (5×10^6) son incubadas durante 20 minutos a 40 22°C con 3 M BCECF-AM (el éster acetometilo de carboxifluoresceína 2-carboxietilo-5-(y-6-), posteriormente lavado tres veces y resuspendido a 5×10^6 células/ml en RPM/HSA. 100 l de células y la cantidad deseada de proteína CHIPS es introducido dentro del compartimiento superior del sistema Transwell y todo se suspende en los pocillos de una placa de microtitulación estándar de 24 pocillos (Costar). Cada pocillo contiene 600 l RPM/HSA con o sin adición del quimiotáctico para el ensayo. Los quimiotácticos son: C5a recombinante (Sigma), interleucina-8 recombinante (Pepro Tech), Activador de Plaquetas Factor-16 (PAF-16; Calbiochem) o fMLP (Sigma). Después de 60 minutos de 45 incubación a 37°C el contenedor de Transwell es levantado de los pocillos y la placa de microtitulación es analizada por fluorescencia en un CytoFluorII (PerSeptiveBiosystems). El grado de fluorescencia es una medida directa para un número de granulocitos que ha migrado a través de la membrana y es expresado como un porcentaje de la fluorescencia del número de células agregadas.

50

Resultados

Figura 10 muestra la inhibición de la migración de neutrófilo dependiente de concentración hacia FLMP por CHIPS purificado, expresado como porcentaje de células de control tratadas con tampón.

55

Ejemplo 6

60 *Producción de polipéptido recombinante con actividad CHIPS en E. coli*

Se produjo CHIPS en *E. coli* y resultó ser tan activo biológicamente como el CHIPS de origen natural de *S. aureus*.

El método de producción utilizado para la producción de CHIPS recombinante puede también ser utilizado por otros (poli)péptidos con actividad CHIPS. Este método de producción es ilustrado más adelante.

65

La secuencia ADN para CHIPS de *S. aureus* es clonada dentro de un vector adecuado que permite la expresión eficiente de CHIPS en células huésped *E. coli* competentes utilizando técnicas de biología molecular convencionales.

ES 2 382 422 T3

La estrategia utilizada permite la expresión de la proteína CHIPS completa vinculada a un etiqueta HIS removible en el N-terminio en el citoplasma de *E. coli*. Fue utilizado el Sistema de Expresión *trc* (vector pTrcHIS B; Invitrogen) que permite la expresión de proteínas no tóxicas en *E. coli*. El vector contiene una etiqueta de polihistidina (6xHis) N-terminal para purificación rápida, un epítipo Xpress para una detección fácil con un anticuerpo anti-Xpress y un sitio de corte de enteroquinasa para eliminación de la etiqueta de fusión.

El ADN cromosómico *S. aureus* Newman fue utilizado como calibre para la reacción PCR utilizando polimerasa Pwo-ADN que resulta en un producto de PCR terminado romo. Los cebadores utilizados son CHIPS-TTT (comienzan exactamente con el primer aminoácido de CHIPS (F) y CHIPS-TAA (que contiene un codón de parada y un sitio EcoRI).

El producto PCR es asimilado con RcoRI y el vector pTrcHIS B con BamHI. El rebose 5' es eliminado con S1-nucleasa para hacer el sitio BamHI de extremo romo exactamente donde la enteroquinasa (EK) asimilara la proteína. Posteriormente el vector es asimilado con EcoRI y ligado con el producto PCR asimilado.

Para transformación del vector, es utilizada TOP-10 *E. coli* (InVitroGen) usando precipitación de calcio estándar (F.M. Ausubel *et al.*, 1990, Protocolos Recientes en Biología Molecular, Jhon Wiley E hijos, Inc., Nueva York, N.Y.). Los clones son examinados en placas que contienen ampicilina y la ligación apropiada del gen CHIPS se verifica mediante secuencia del plásmido aislado (clon-29).

Después de la expresión del gen CHIPS, las bacterias *E. coli* se lisan y la mezcla de proteínas es aplicada sobre una columna de afinidad ión-níquel (ProBond). Por lo tanto se inicia un cultivo de clon29 en el medio LB + 50 g/ml ampicilina con 1 mM IPTG durante 4 horas a 37°C. Las bacterias son centrifugadas y el granulado resuspendido en tampón frío fosfato pH 7.8 y almacenado a -20°C. Para la lisis celular, se agrega lisozima (100 g/ml) durante 15' en hielo, se sonicán los tubos, se congelan en N₂ líquido y se descongelan luego en un baño de agua a 37°C. Este ciclo de sonicación/congelación/descongelación se repite tres veces.

Posteriormente se agrega RNasa y DNasa (5 g/ml) durante 30' en hielo. La mezcla es centrifugada a 3000 g durante 30' a 4°C y filtrada a través de un filtro de 0.45 m. El lisado final es diluido 1:1 con tampón de Fosfato pH 7.8 frío y pasado por una columna Nickel cargada (InVitroGen). La columna es lavada con tampón de fosfato pH 7.8, con tampón de fosfato pH 6.0 y con tampón de fosfato pH 5.3. El CHIPS ligado es eluido con 500 mM de imidazol en tampón de fosfato pH 6.0.

La etiqueta HIS es eliminada por escisión de enteroquinasa seguido por la eliminación de la proteasa con una resina de afinidad enteroquinasa EK-Away. Por lo tanto el efluente se dializa durante la noche en tampón de asimilación frío (50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ y 0.1% Tween-20, pH 8.0), filtrado a través de un filtro de 0.45 m y asimilado con 0.175 l de producto Enteroquinasa/ml de HIS-CHIPS. Esta cantidad de Enteroquinasa es dependiente del lote y resulta en una asimilación parcial para evitar la generación de productos de ruptura. El producto asimilado es dializado contra tampón de fosfato pH 7.8 y pasado sobre una columna fresca Nickel para eliminar CHIPS etiquetados HIS no escindidos (HIS-CHIPS); el producto pasado es CHIPS recombinante puro (rCHIPS). El HIS-CHIPS sin asimilar puede ser eluido otra vez de una columna Nickel para una segunda ronda de asimilación. La columna Nickel es finalmente lavada con 50 mM EDTA, 0.5 M NaOH, agua, 5 mg/ml NiCl₂, agua y se almacena en 20% de etanol.

Todos los pasos en el aislamiento y asimilación de HIS-CHIPS son revisados por SDS-PAGE en un gel de 16.5% Tris-Tricine Ready (BioRad). Las muestras son mezcladas 1:1 con tampón de muestra (200 mM Tris-HCl pH 6.8 2% SDS, 40% glicerol, 0.04% Coomassie), hervidas durante 5 minutos y cargadas en el gel. La etiqueta HIS de la proteína expresada contiene un epítipo X-press que permite la detección del producto HIS-CHIPS mediante Western blot utilizando el anticuerpo anti-X-press (InVitroGen). En adición, CHIPS es específicamente detectado con el anticuerpo péptido policlonal de conejo anti-CHIPS. Las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa, bloqueada con 4% de gelatina en PBS y probada con el anticuerpo y el apropiado conjugado etiquetado de peroxidasa secundaria (Harlow & Lane, 1998, Anticuerpos: un manual de laboratorio, Laboratorio Cold Spring Harbor).

La inhibición dependiente de concentración de CHIPS recombinante (rCHIPS) en la expresión del receptor para fMLP (FPR) y C5a (C5aR) en neutrófilos fue demostrada de la siguiente manera. Se incubaron células con diversas concentraciones rCHIPS durante 15 minutos a temperatura ambiente, puestas en hielo y posteriormente probadas con ya sea fMLP etiquetado BODIPY (ver ejemplo 1.2) o un anticuerpo monoclonal dirigido contra C5aR (clon 5 S/1, SeroTec) en combinación con un Ig de cabra anti ratón secundario etiquetado FITC (DAKO, 1:30). Finalmente las células fueron lavadas y analizadas para receptor de expresión en un FAScan midiendo la fluorescencia de 5000 neutrófilos. La expresión de receptor es comparada a células tratadas con tampón y expresadas como un valor relativo.

El deterioro dependiente de concentración de la liberación de calcio intracelular libre inducido por fMLP y C5a en neutrófilos fue probado como sigue. Se cargaron células con una sonda intracelular específica de calcio (Fluo-3, acetoximetilo (AM) ester; Sondas Moleculares) y se incubaron con diversas concentraciones rCHIPS durante 15 minutos a temperatura ambiente. De cada muestra fue determinado el valor de fluorescencia inicial en el FAScan mediante la medición de 2000 células. Posteriormente, se agregó estímulo (10⁻⁹ M fMLP o 10⁻¹⁰ M rC5a) y la intensidad de fluorescencia de la misma muestra se determinó exactamente 15 segundos después de la administración del estímulo (el punto de tiempo óptimo para ambos agonistas). La activación de neutrófilos con fMLP o C5a inicia un aumento rápido y transitorio en concentración de calcio intracelular libre el cual es medido por aumento de señal de fluorescencia

Fluo-3. De cada muestra activada, es sustraído el valor inicial de fluorescencia basal. Los resultados son expresados como un porcentaje de células tratadas con tampón estimuladas con fMLP o C5a.

5 Resultados

Figura 11 es una imagen representativa de un SDS-PAGE que muestra el CHIPS recombinante purificado final (rCHIPS). Las dos vías de acompañamiento (1 y 3) muestran el producto recombinante completo que es codificado por el vector generando la proteína CHIPS con una etiqueta Hestidina adicional y sitio de corte de enteroquinasa. Esto codifica para una proteína con un peso molecular aparente de 21 kDa, mientras que CHIPS tratados por Enteroquinasa purificada pasa a un peso molecular aparente de 17 kDa, igualmente a lo mostrado para CHIPS purificado natural de *S. aureus* (ver Ejemplo 1.1 y Figura 2). El rCHIPS purificado fue caracterizado por MALDITOF MS y reveló una masa molecular de 14.12250, que es altamente comparable con la masa molecular prevista de 14.12217 en base a la secuencia CHIPS.

Figuras 12 y 13 ilustran la efectividad biológica.

Ejemplo 7

Producción de una proteína CHIPS sintética

Se demostró según la invención que es posible producir un polipéptido sintético que tiene exactamente la misma actividad que CHIPS natural así como recombinante. El proceso de producción es como sigue:

La síntesis del péptido FTFEPFPTNEEIESNKKMLEKEKAYKES-FKNSGLPTTLGKLDERLRNNYLKKGTKNSAQFEKM-VILTENKGYTYVYLNTPLAEDR-KVELLGKMYKTYFFKKGESKSSYVINGPGKTNEYAY por la resina TGT con Tirosina 9-fluorenilmetiloxycarbonilo-and O t-but protegida [Fmoc Tyr (t-but)] unida a él (5 g, 0.3 mmol, NovaBiochem) fue transferida al sintetizador de péptido, y una solución de piperidina (12 ml) en dimetilformamida (DMF; 18 ml) se agregó a la resina. La solución se agitó durante 1 hora y la resina lavada con DMF (3 x 30 ml) seguido por diclorometano (DCM; 3 x 30 ml) y dejada a secar al vacío durante 5 minutos. Los aminoácidos restantes fueron montados secuencialmente empleando química Fmoc estándar. La escisión de la proteína se logró mediante tratamiento de la resina de la proteína con una solución de ácido trifluoroacético/tetraisopropilsilano/H₂O [90:8:2 v/v/v] durante 2.5 horas. El producto crudo (2.1 gms) fue aislado por precipitación por éter seguido por purificación mediante el uso de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento. El producto purificado fue caracterizado por MALDI MS.

Referencias que describen métodos similares son:

E Bayer *et al.*, in: *Peptides, Chemistry, Structure and Biology*. Proceedings of the 13th American Peptide symposium.

RS Hodeges and JA Smith (eds) ESCOM, Leiden, (1994) p. 156.

G Grüber *et al.*, in: *Innovation and perspectives in Solid Phase Synthesis 3rd International Symposium*. RE Pron (ed) Mayflower Worldwide, Birmingham (1994) p. 517.

Ejemplo 8

Competición para la unión de CHIPS a su receptor putativo

8.1 Producción de CHIPS⁴⁻¹²¹ recombinante

Cuando varias colonias de *E. coli* conteniendo el plásmido con CHIPS recombinante fueron analizadas para una inserción apropiada del gen *chp* mediante secuenciación, varias inserciones incompletas fueron encontradas. Una de ellas que contiene la etiqueta HIS completa, sitio de corte de enteroquinasa y la proteína CHIPS menos los primeros tres aminoácidos (CHIPS⁴⁻¹²¹; clon 19) fue propagada adicionalmente y purificada como se describe para CHIPS completo (ver Ejemplo 6).

8.2 Competición con la unión CHIPS-FITC

En tubos Falcon 5 l, diluciones seriadas de CHIPS recombinante o CHIPS⁴⁻¹²¹ fueron preparadas y mezcladas con 5 l CHIPS-FITC (10 g/ml; ver Ejemplo 2). Después 50 l de neutrófilos aislados en 5 x 10⁶ células/ml se añadieron e incubaron durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron y analiza para unión CHIPS-FITC por citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 2.

Resultados

Figura 14 muestra la inhibición dependiente de concentración de la unión CHIPS-FITC ya sea por CHIPS recombinante así como por CHIPS⁴⁻¹²¹ mutante recombinante. Ambas preparaciones muestran un patrón de inhibición similar con iguales concentraciones eficaces.

10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un (poli) péptido con actividad de la Proteína Inhibidora de la Quimiotaxis de *Staphylococcus aureus* (CHIPS), dicha secuencia de nucleótido correspondiendo a una secuencia que es seleccionada del grupo consistente de:
- 10 a) una secuencia de nucleótido que comprende al menos parte de la secuencia como se representa en la Figura 4 (SEC ID NO 4);
- 15 b) secuencias de nucleótidos que codifican un (poli)péptido con actividad CHIPS y que tienen la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 5 (SEC ID NO 5);
- c) secuencias de nucleótidos que son al menos 40% idénticos a cualquiera de las secuencias de nucleótidos a) o b);
- 20 d) secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas con cualquiera de las secuencias de nucleótidos a), b) o c), y
- e) secuencias de nucleótidos complementarias a cualquiera de las secuencias de nucleótidos a), b), c) o d), donde las condiciones rigurosas en el paso d) están constituidos por hibridación durante la noche a 42°C en 5xSSC y lavado a 65°C en 0.1xSSC y donde la actividad CHIPS es la capacidad de comprometer específicamente la unión ligando-(C5a o MLP).
- 25 2. Una molécula de ácido nucleico aislada según la Reivindicación 1, de la cual la parte de la secuencia de nucleótidos como se define en la Reivindicación 1 bajo a) corresponde a nucleótidos 1 a 490 de la Figura 4 (SEC ID NO 4).
- 30 3. Una molécula de ácido nucleico aislada según la Reivindicación 1 o 2, de la cual la parte de la secuencia de nucleótidos como se define en la Reivindicación 1 bajo a) corresponde a nucleótidos 41 a 490 de la Figura 4 (SEC ID NO 4).
- 35 4. Una molécula de ácido nucleico aislada según la Reivindicación 1, 2 o 3, de la cual la parte de la secuencia de nucleótidos como se define en la Reivindicación 1 bajo a) corresponde a nucleótidos 125 a 490 de la Figura 4 (SEC ID NO 4).
- 40 5. Una molécula de ácido nucleico aislada según las Reivindicaciones 1-4, donde la secuencia de nucleótidos como se define en la Reivindicación 1 bajo c) es al menos 50% idéntica a cualquiera de las secuencias de nucleótidos a) o b).
- 45 6. Una molécula de ácido nucleico aislada según la Reivindicación 5, donde la secuencia de nucleótidos como se define en c) es al menos 70% idéntica a cualquiera de las secuencias de nucleótidos a) o b).
7. Una molécula de ácido nucleico aislada según la Reivindicación 6, donde la secuencia de nucleótidos como se define en c) es al menos 90% idéntica a cualquiera de las secuencias de nucleótidos a) o b).
- 50 8. Una molécula de ácido nucleico aislada según las Reivindicaciones 1-7, cuyo ácido nucleico es ADN, ARN o ADNc.
9. Un vector recombinante que comprende al menos una molécula de ácido nucleico aislada según las Reivindicaciones 1-8.
- 55 10. Un método para hacer un vector recombinante que comprende la inserción de al menos una molécula de ácido nucleico aislada según las Reivindicaciones 1-8 dentro de un vector.
11. Un huésped procariótico recombinante que comprende al menos una molécula de ácido nucleico aislada según las Reivindicaciones 1-8, un vector según la Reivindicación 9.
- 60 12. Un huésped recombinante según la Reivindicación 11, donde el huésped es seleccionado del grupo que consiste de la bacteria *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, o *Staphylococcus aureus*.
- 65 13. Un método para la producción de un (poli)péptido recombinante con actividad CHIPS, que comprende el cultivo de un huésped recombinante de la Reivindicación 11 o 12 bajo condiciones tales que dicho (poli)péptido es expresado y recuperar de dicho (poli)péptido donde la actividad CHIPS es la capacidad de comprometer específicamente la unión ligando-(C5a o fMLP).
14. Un método según la Reivindicación 13, donde el huésped es una célula *Escherichia coli*.

ES 2 382 422 T3

15. Un método según la Reivindicación 13, donde el huésped es una célula *Staphylococcus aureus*.

16. Un método según la Reivindicación 15, donde la célula *Staphylococcus aureus* es de una cepa que ya produce una proteína endógena con actividad CHIPS (CHIPS).

5

17. Un método para el aislamiento de un organismo de un gen que codifica una proteína con actividad CHIPS, que comprende cribar una biblioteca genómica o ADNc de tal organismo con una sonda basada en la molécula de ácido nucleico según las Reivindicaciones 1-8, aislar los clones positivos, y probar si los clones positivos muestran actividad CHIPS donde la actividad CHIPS es la capacidad de comprometer específicamente la unión ligando-(C5a o fMLP).

10

18. Prueba de diagnóstico para uso en el diagnóstico de pacientes infectados con *Staphylococcus aureus* para la presencia en la *S. aureus* infecciosa del gen CHIPS, cuya prueba es una prueba PCR para la cual los cebadores son diseñados en base a la secuencia de nucleótidos representada en la Figura 4 (SEC ID NO 4).

15

20

25

30

35

40

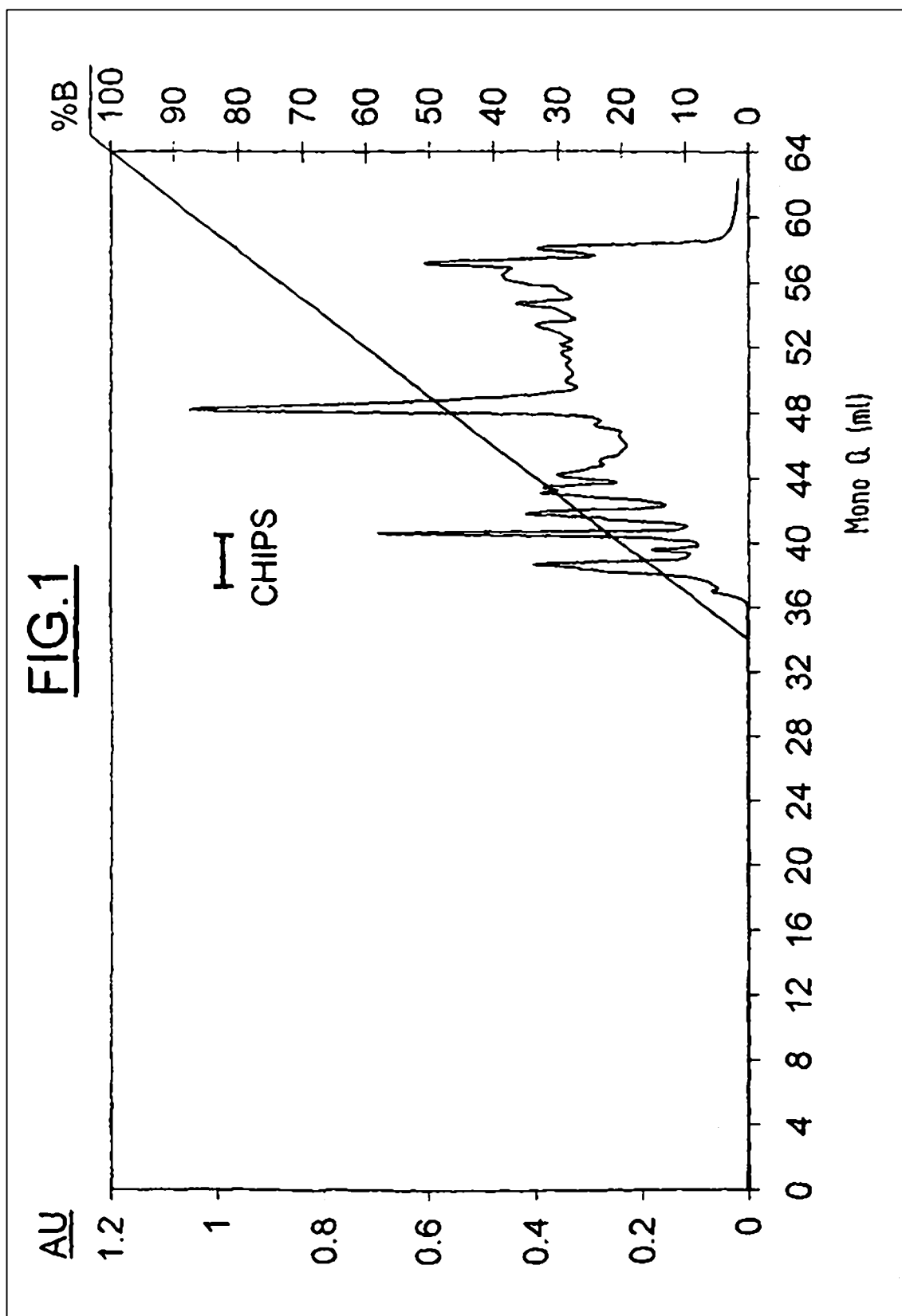
45

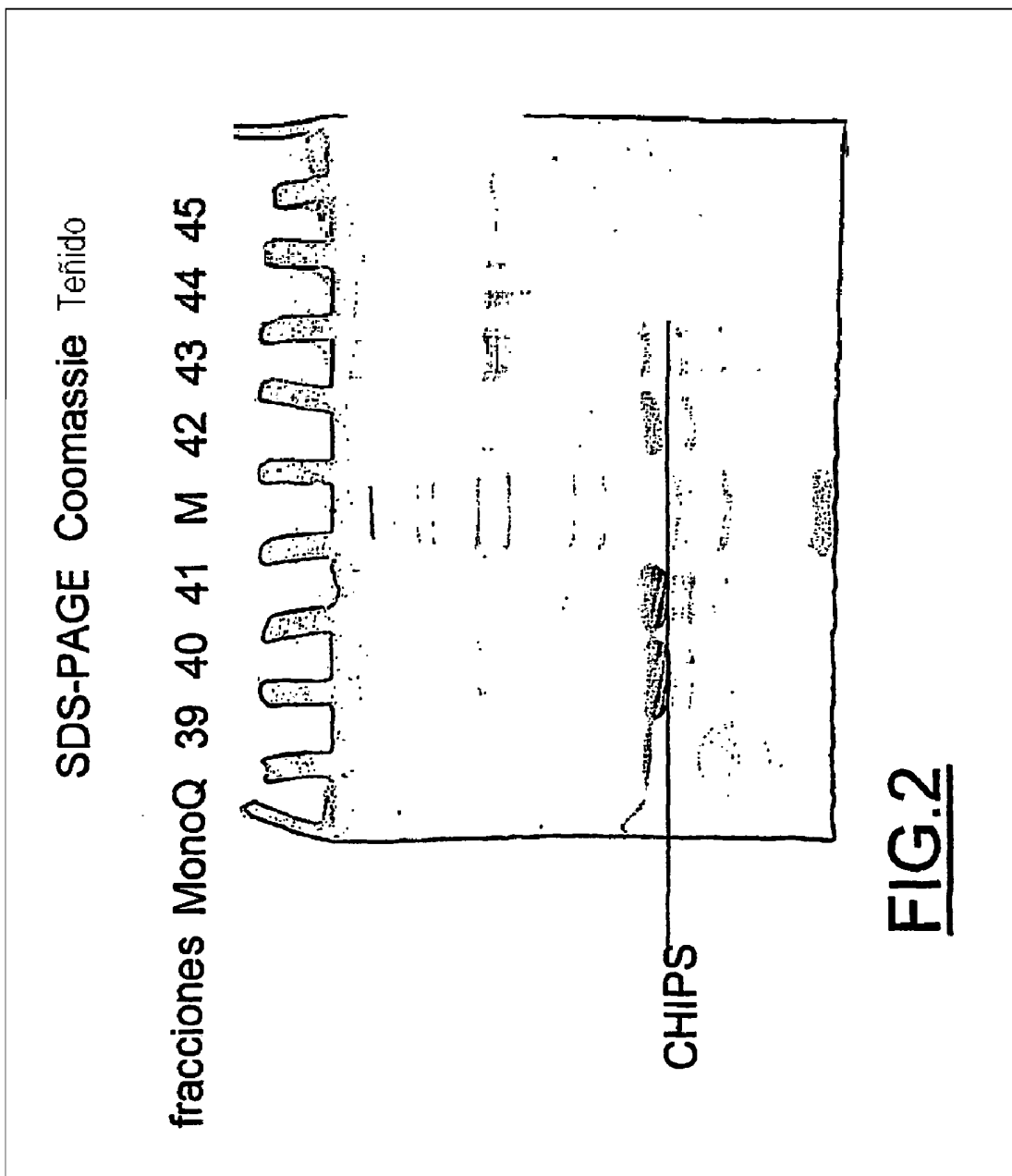
50

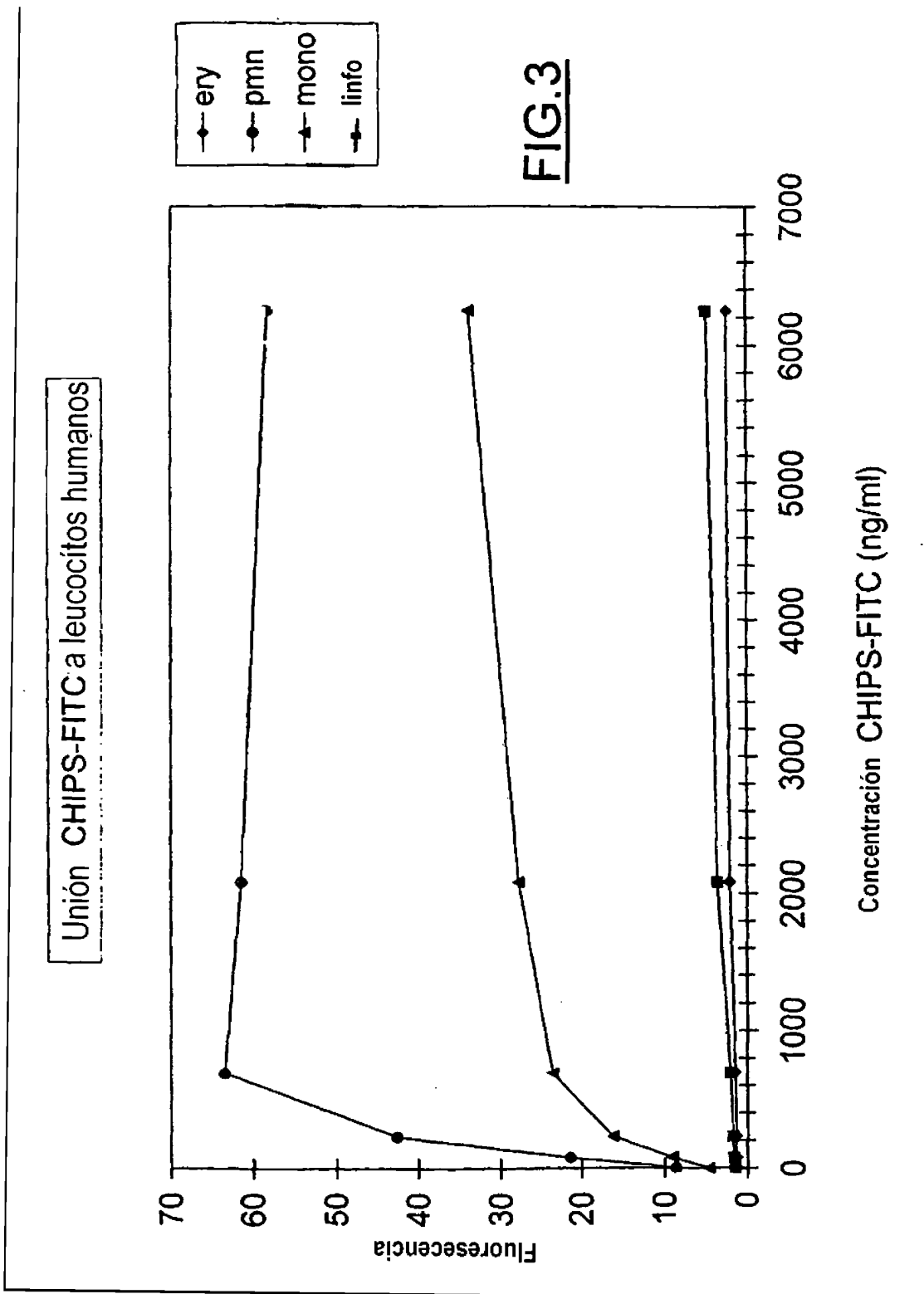
55

60

65







1 ATAAATTAAATATAGAAATTTAAGGAGAATTAACATCATTAATGAAAAAGAAAATTAGCAACAACAGTTT

69 TAGCATTAAAGTTTTTAACGGCAGGAATCAGTACACCATCATTCAGCGAAAGCTTTTACTTTTGAA

T

137 CCGTTCCCTACAAATGAAGAAAATAGAAATCAAAATAAGAAAATGTTAGAGAAAAGAAAAGCTTATAAAGA

A

205 ATCATTAAAAATAGTGGTCTTCCCTACAACGCTAGGAAAATTAGATGAACGTTTGAGAAAATTATTTAA

273 AGAAAGGCACAAAAAATTCGCTCAATTTGAAAAAATGGTTATTTTAACTGAAAAATAAAGGTTACTAT

341 ACAGTATATCTGAATACACCACTTGCTGAAGATAGAAAAAATGTTGAGTTACTAGGTAATAATGTATAA

T

409 AACATACTCTTTAAAAAAGGAGAGCTAAATCATCTTATGTAATTAATGGTCTGGAAAAAATAATG

C

477 AATATGCATACTAATAGTAGTTACATAAAATTAAGGAGTAGATATTTCTTTTTTATATAAAGGTTTGCC

545 AGACATTTCACTTGCCAAACCTTTATATATCTAATTAATCAAACTGCACTAAACTT **FIG.4**

Secuencia de aminoácido derivada de CHIPS

FTFEPFPTNEEIEESNKKMLEKEKAYKESFKNSGLPTTLGKL

DERLRNYLKKGTKNSAQFEKMVILTENKGYTYVYLNTP

AEDRKNVELLGKMYKTYFFKKGESKSSYVINGPGKTNEYAY

FIG.5

PCR o el gen chips en S.aureus

- 1. S.aureus Newman
- 2. S.aureus Newman
- 3. S.aureus Col
- 4. S.aureus Col
- 5. S.aureus 1690
- 6. S.aureus 1690

FIG. 6

PCR en S.aureus

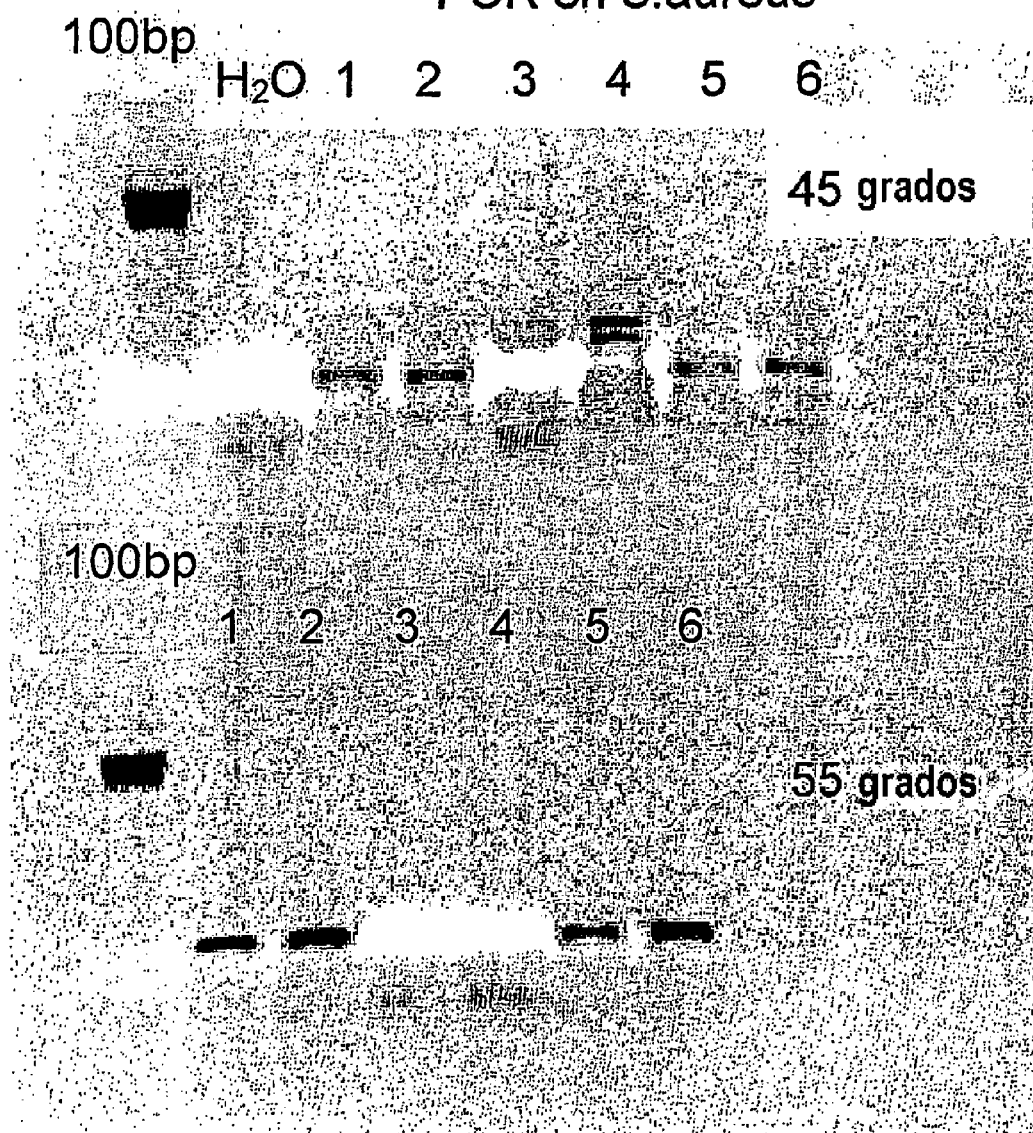
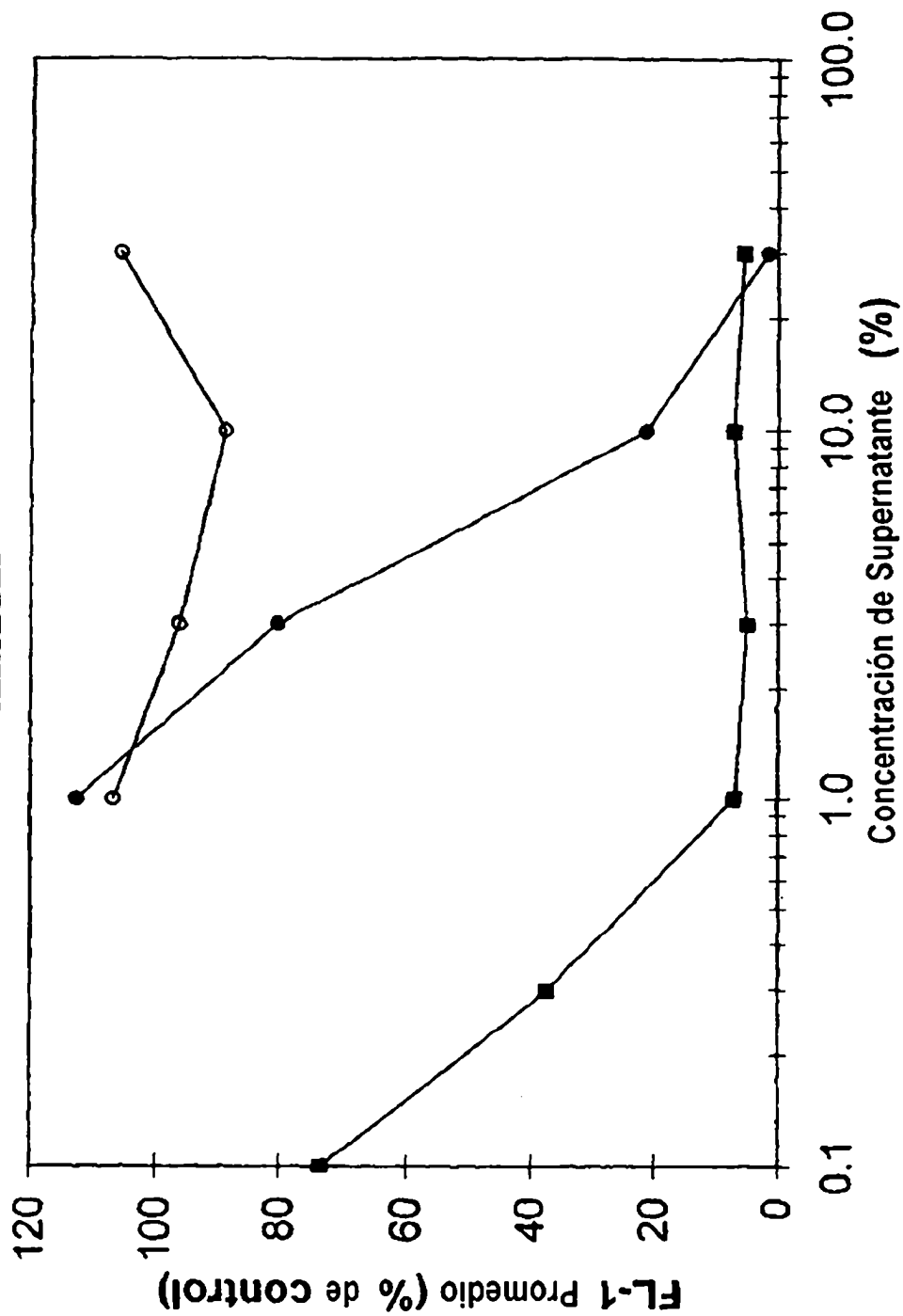
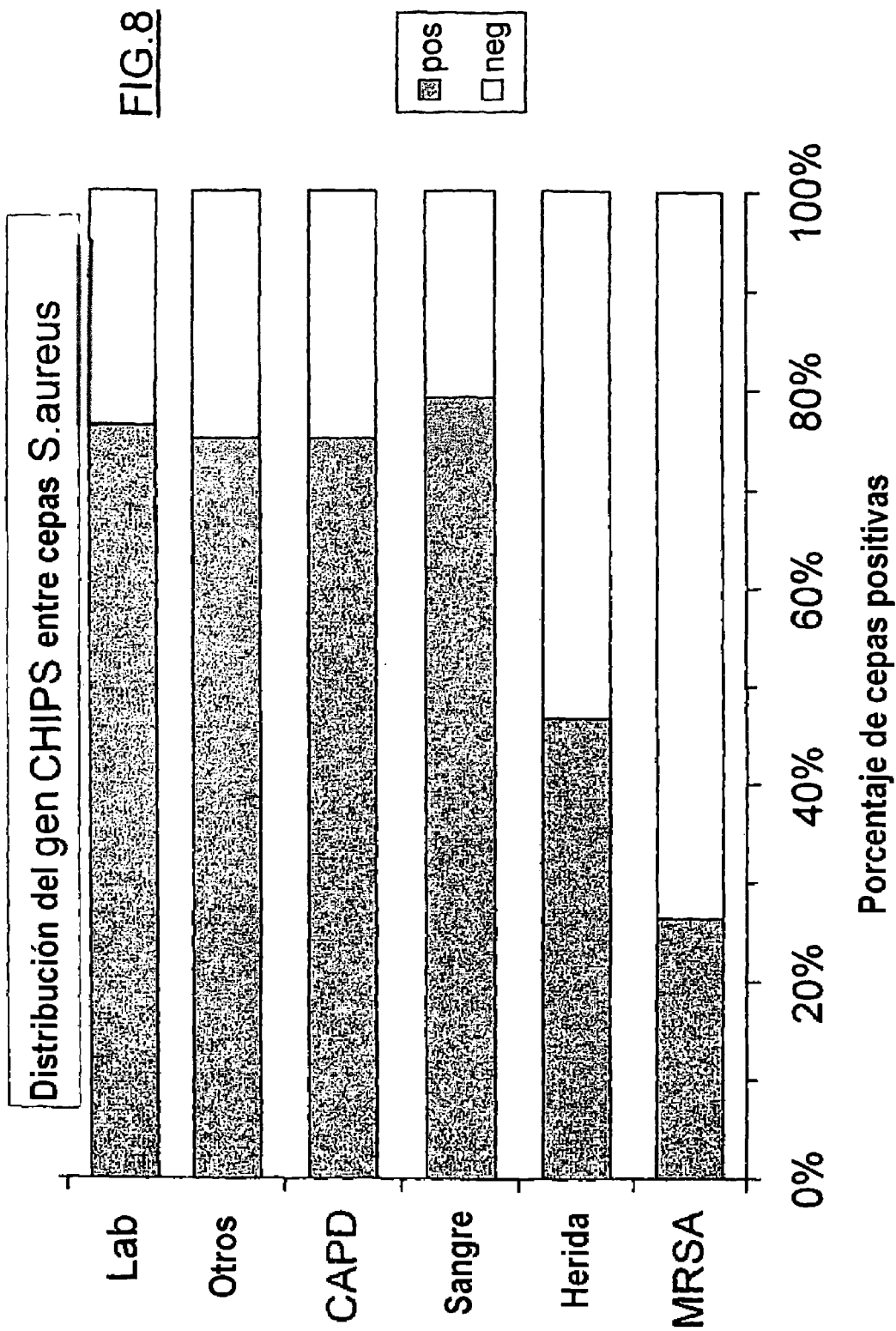
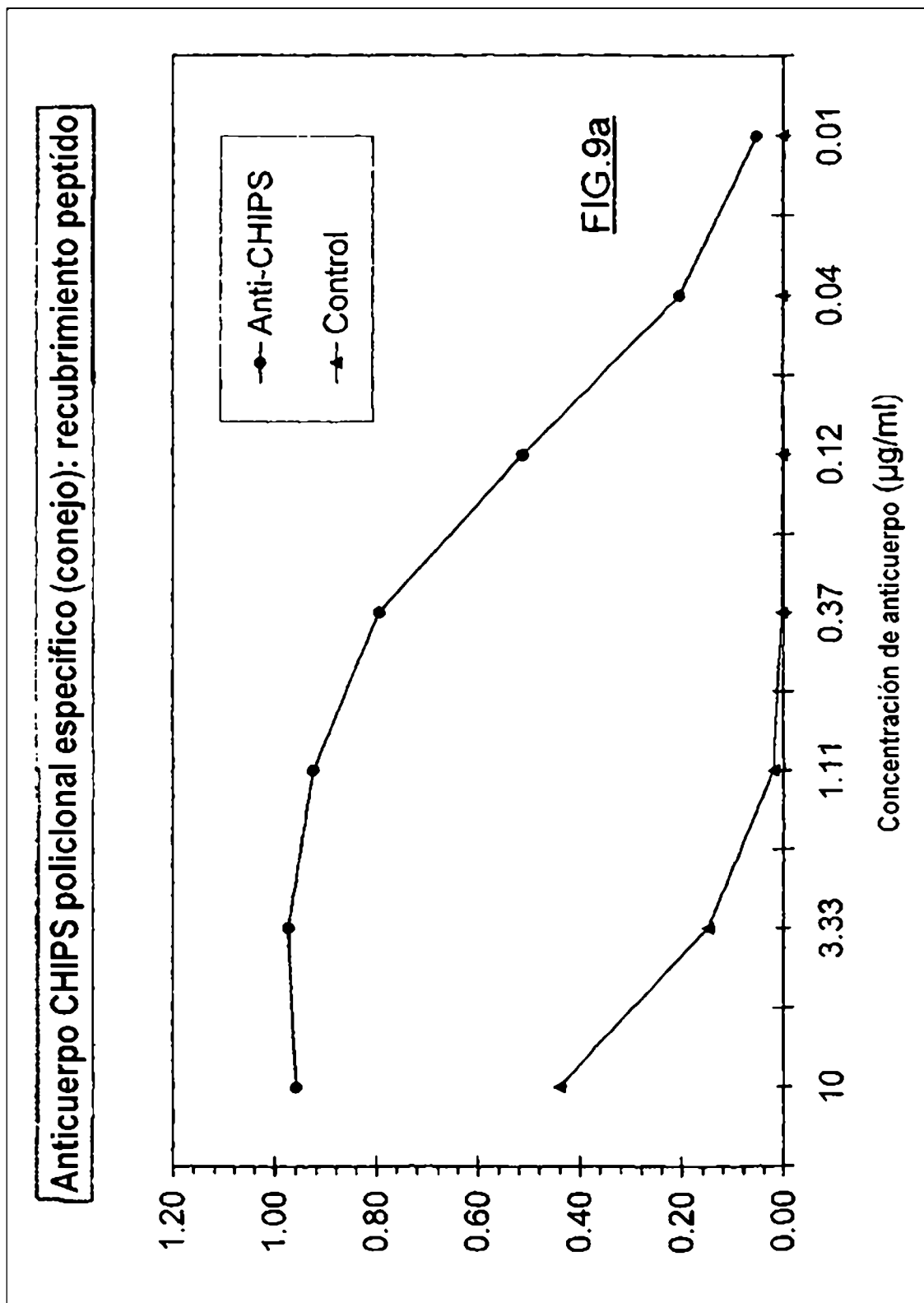


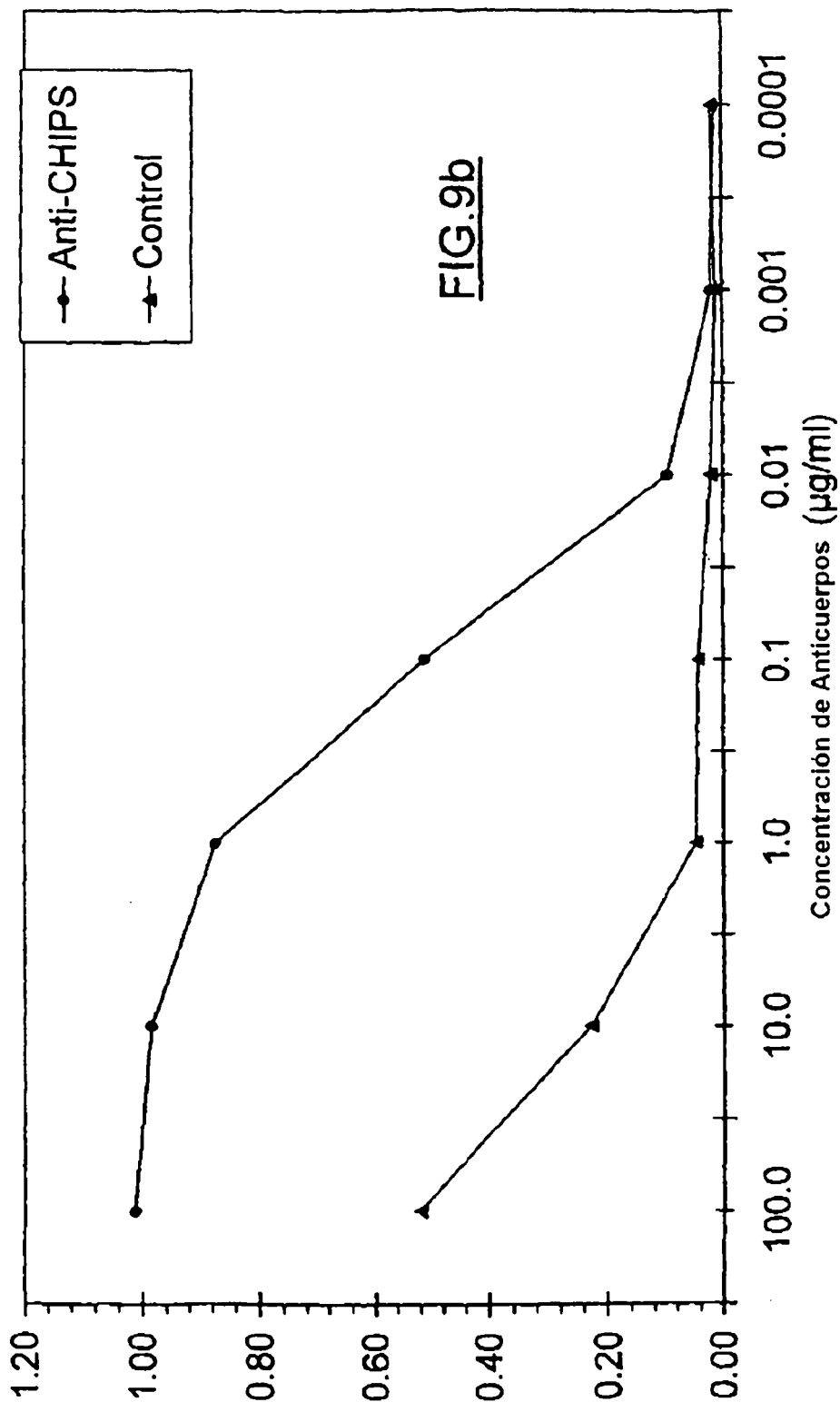
FIG.7

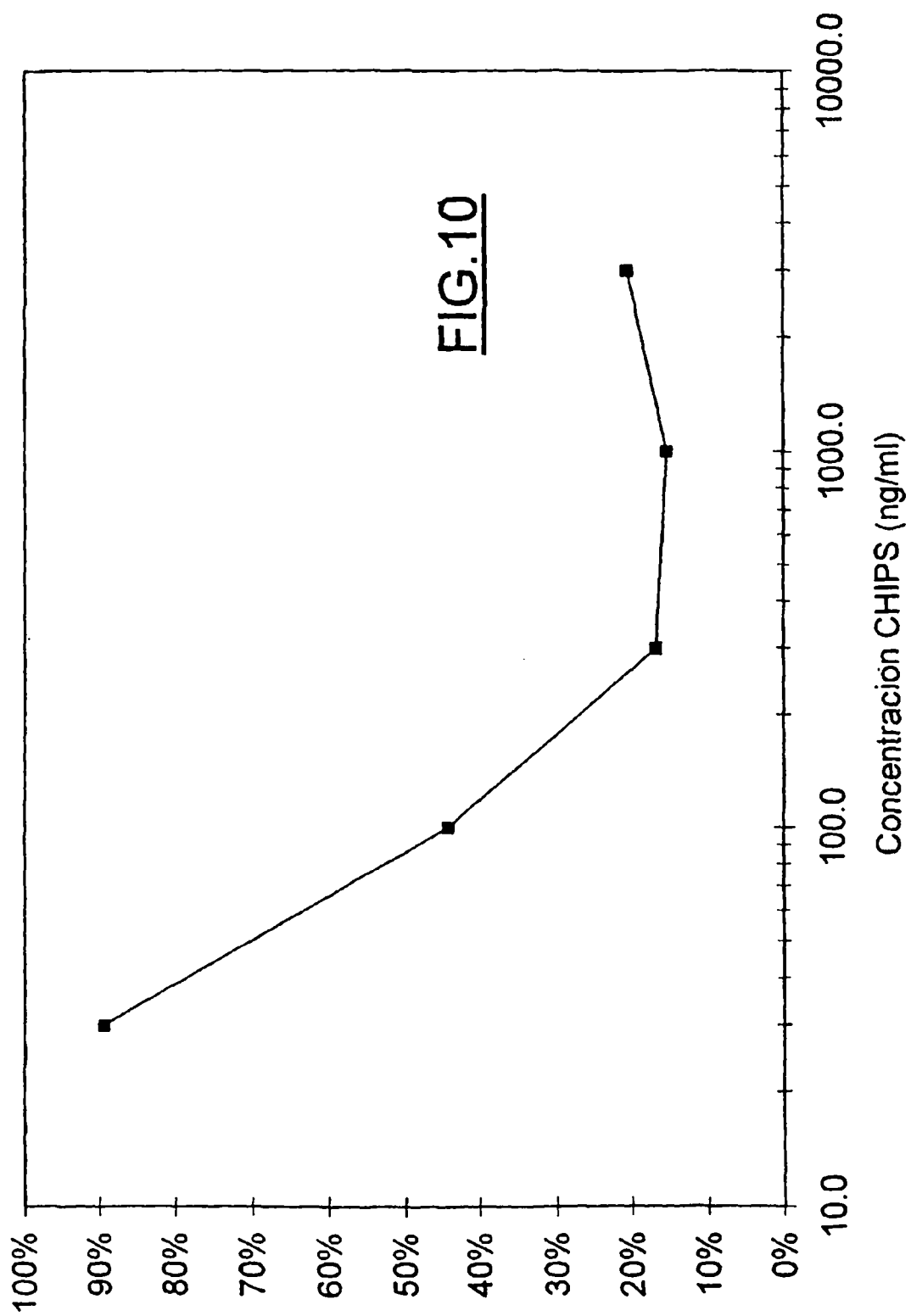






Anticuerpo CHIPS policlonal específico (conejo) Recubrimiento CHIPS





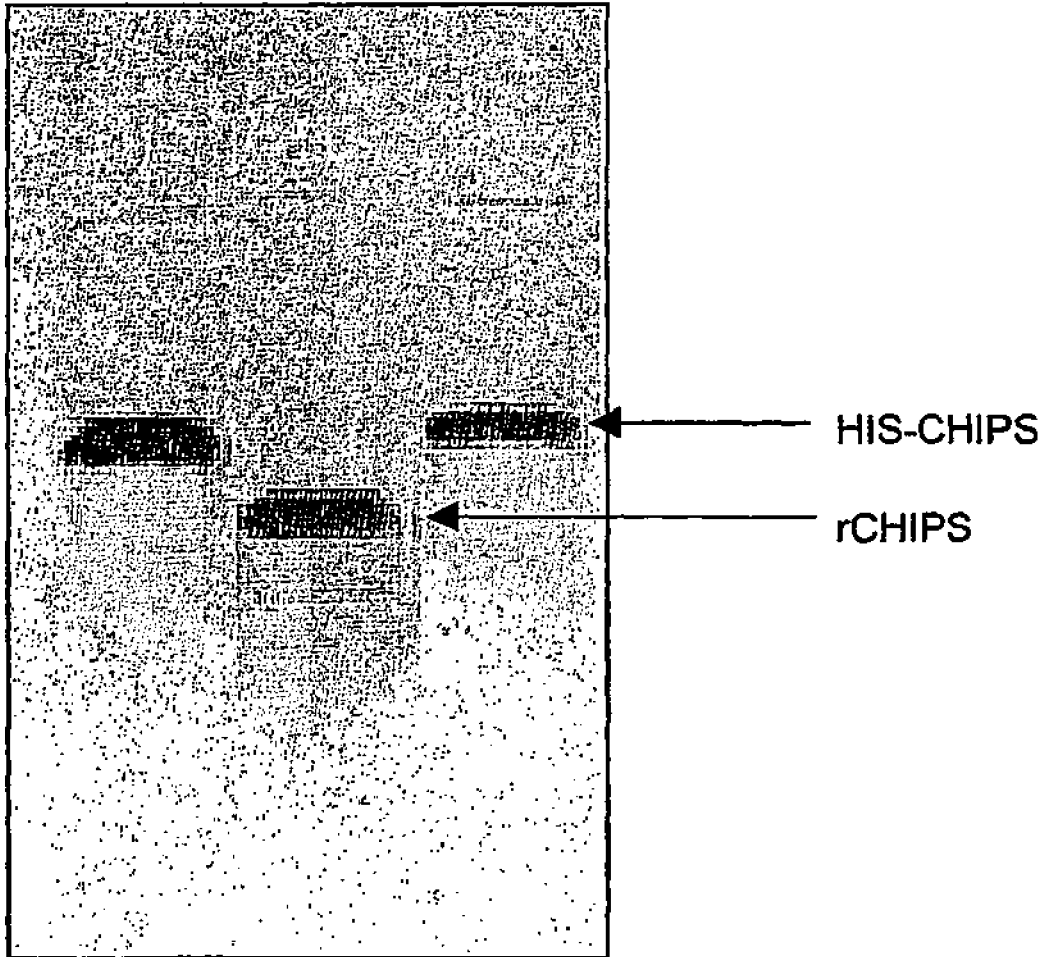


FIG.11

Fig. 12

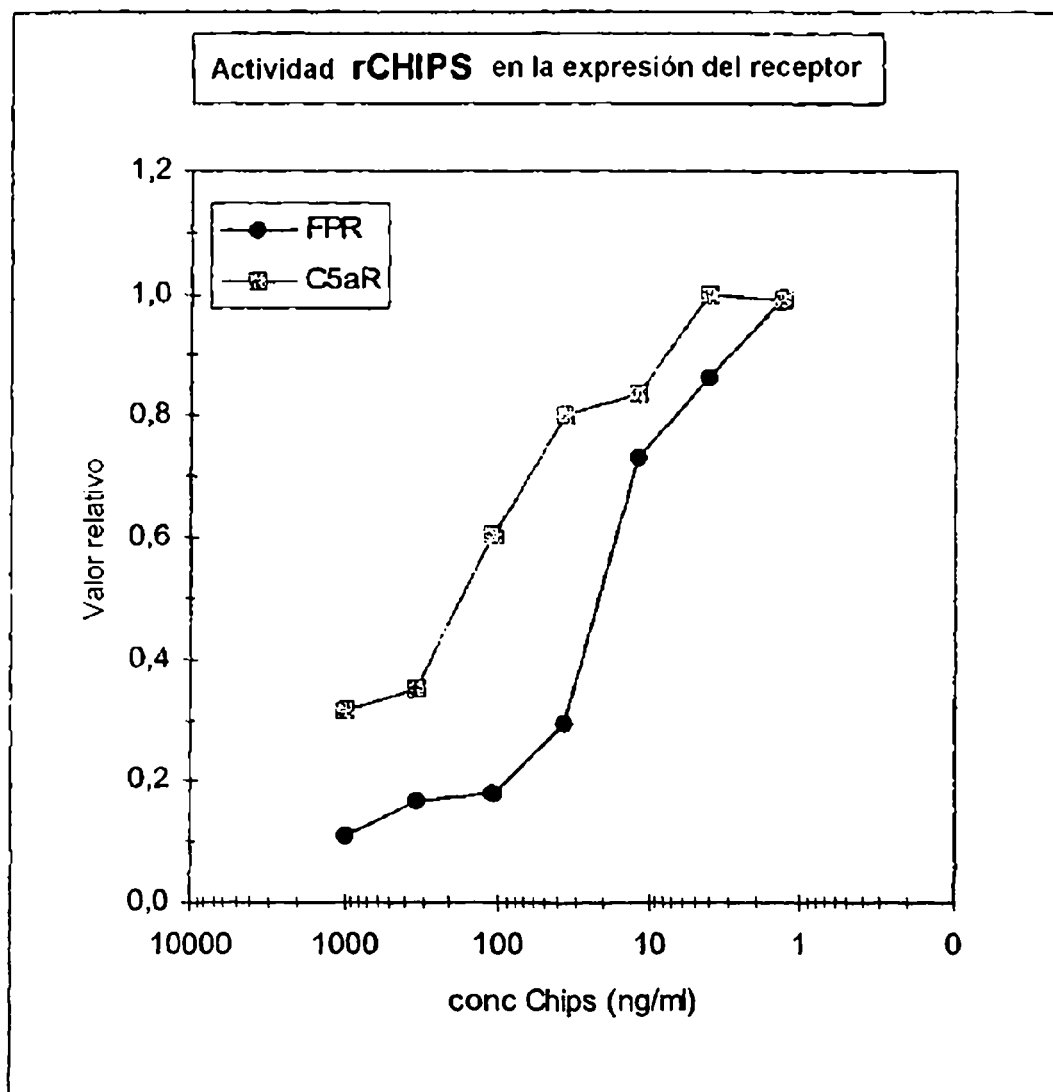


Fig. 13

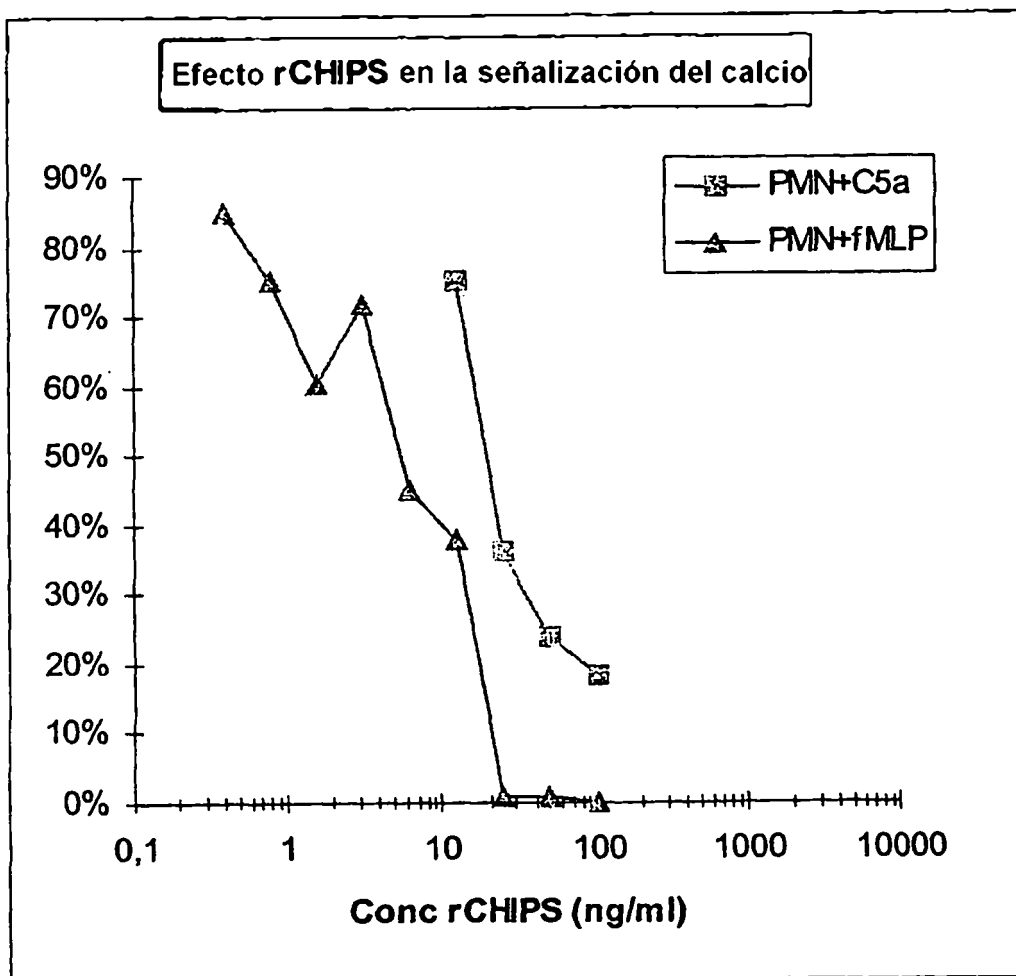


Fig. 14

