

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 720**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2010 E 10700742 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2382316**

54 Título: **Un polipéptido de hemolisina alfa recombinante de Staphylococcus aureus, que tiene una delección en el dominio del tallo y secuencias heterólogas insertadas**

30 Prioridad:

19.01.2009 EP 09150888

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

07.08.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE LIÈGE (33.3%)
Interface Entreprises-Université Avenue Pré-Aily 4
4031 Angleur;
CENTRE D'ECONOMIE RURALE (33.3%) y
UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES (33.3%)**

72 Inventor/es:

**FILÉE, PATRICE;
RHAZI, NOUREDDINE;
GALLENI, MORENO;
TAMINIAU, BERNARD;
JOLOIS, OLIVIER;
COLLARD, ALFRED y
JACQUET, ALAIN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 483 720 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

Un polipéptido de hemolisina alfa recombinante de *Staphylococcus aureus*, que tiene una delección en el dominio del tallo y secuencias heterólogas insertadas

La invención se refiere al desarrollo de una forma modificada por ingeniería genética de hemolisina alfa bacteriana. En particular, la presente invención se refiere a un polipéptido de hemolisina alfa monocatenaria recombinante de *Staphylococcus aureus*, que tiene una delección en el dominio del tallo y comprende al menos una secuencia heteróloga adicional insertada en sitios permisivos de dicho polipéptido de hemolisina alfa recombinante.

Desde el desarrollo de técnicas de ADN recombinante al final de los años 70, se ha usado tecnología de fusión génica para generar proteínas multifuncionales para una amplia serie de aplicaciones. Se utilizan proteínas de fusión en investigación científica de proteínas para diversas aplicaciones. Para construir dichas proteínas de fusión, son posibles dos tipos de conexión. Una es fusión "de extremo a extremo" en la que el extremo N terminal de un dominio se une con el extremo C terminal del otro dominio. La segunda es fusión "de inserción" en la que se inserta un dominio en fase en el medio del otro dominio parental.

Se usan proteínas o fragmentos de las mismas para activar la inmunización. La inmunización activa implica intentar estimular respuestas inmunitarias humorales y celulares administrando antígenos. Estos antígenos pueden ser formas destruidas o debilitadas de los agentes que provocan la enfermedad, subunidades de los agentes infecciosos y proteínas recombinantes correspondientes a las proteínas nativas o a polipeptidos. La inmunización pasiva implica proporcionar anticuerpos denominados gamma globulinas a alguien que se ha infectado con la enfermedad.

Un obstáculo principal en el desarrollo de vacunas es la variabilidad, complejidad y adaptabilidad de los patógenos. Por ejemplo, la variabilidad de *S. aureus* está asociada con sus doce serotipos que se relacionan con la composición de polisacáridos capsulares. La complejidad de este microorganismo se debe a su fenotipo porque *S. aureus* es capaz de producir más de cuarenta factores de virulencia. La adaptabilidad se relaciona con la capacidad de la bacteria para acumular mutaciones y para volverse resistente al tratamiento con antibióticos y aún más para escapar al sistema inmunitario. Esto explica la tendencia de algunos grupos farmacéuticos a desarrollar vacuna multivalente combinando varios antígenos en una misma formulación de vacuna. En este contexto, una vacuna que consiste en una única proteína sería menos costosa de fabricar y tiene la ventaja de un proceso de producción práctico y ensayos de control de calidad más sencillos que una vacuna consistente en varias proteínas recombinantes.

La caracterización de epítomos es médicamente importante en aplicaciones tales como vacunación y desarrollos de anticuerpos. Inmunizar solamente con el epítomo en lugar de con el organismo completo o con el antígeno aislado tiene varias ventajas tales como la seguridad, las dificultades para obtener antígenos puros, los problemas de inmunodominancia de algunos epítomos o la posibilidad de centrar la respuesta inmunitaria en regiones proteicas que son de importancia crucial para la actividad biológica de la proteína.

Si se ha permitido que diversas técnicas de mapeo de epítomos desencadenen interacciones anticuerpos/antígeno, las posibilidades de suministrar estos epítomos de linfocitos B pequeños al sistema inmunitario son escasas. De acuerdo con la bibliografía, los enfoques clásicos que consisten simplemente en fusionar epítomos dan lugar a polipéptidos que son escasamente antigénicos. Un enfoque alternativo de vacunas de epítomos es la conjugación con un vehículo capaz de inducir una ayuda de linfocitos T eficaz para linfocitos B productores de anticuerpos. En consecuencia, es esta característica lo que limita drásticamente el uso de vacunas de epítomos obtenidas por fusión génica. De esta manera, se ha demostrado que las partículas de tipo virus son armazones moleculares adecuados de epítomos de linfocitos B. Sin embargo este enfoque se enfrenta con frecuencia al "problema de ensamblaje" que se produce cuando la fusión o inserción de epítomos evita el ensamblaje de la proteína del núcleo para formar la partícula de tipo virus.

La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* secretan hemolisina alfa (HA) estafilocócica como un monómero soluble en agua de un polipéptido de 293 restos. Esta toxina forma poros heptaméricos en membranas de células susceptibles tales como plaquetas, eritrocitos, monocitos de sangre periférica, macrófagos, queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales. La HA está dotada de propiedades hemolíticas, citotóxicas, demonecróticas y letales tanto de seres humanos como de animales. También se ha indicado un papel de esta toxina en la formación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* y más concretamente en interacciones célula a célula. La estructura cristalina del heptámero HA en detergente indica un objeto con forma de seta en la que la mitad inferior del tallo (K110 a Y148), un barril β de 14 cadenas, forma un canal transmembrana compuesto de restos de las siete regiones ricas en glicina centrales de las cadenas polipeptídicas (Figura 1). El tercio N y C terminal del polipéptido se organiza en una estructura de tipo sándwich β que participa en la formación del sombrero de la seta localizada fuera de la célula diana.

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva, resistente, que es causa frecuente de enfermedad tanto adquirida en comunidad como nosocomial. La colonización asintomática transitoria es habitual, apareciendo en hasta el 40 % de niños y adultos. En una minoría de casos, la infección por *S. aureus* se asocia con enfermedad grave, incluyendo bacteriana, osteomielitis, endocarditis, meningitis y formación de abscesos. Las infecciones por *S.*

aureus son relativamente difíciles de tratar, y pueden producirse enfermedades invasivas y recaída después del tratamiento con antibióticos.

Las infecciones provocadas por *S. aureus* también son problemáticas en animales. La mastitis bovina es la enfermedad más costosa para la industria lechera en todo el mundo, con pérdidas estimadas en 2 mil millones de dólares cada año solamente en los Estados Unidos. La mastitis es la razón principal para el sacrificio, por ejemplo se ha indicado que la mastitis es la razón para el 15 % de las vacas sacrificadas en los Estados Unidos. *S. aureus* es una de las causas más frecuentes de mastitis bovina, y a pesar de varias décadas de investigación dirigida a combatir este patógeno, sigue siendo un problema económico sustancial para productores de leche en todo el mundo.

El tratamiento se hace más difícil por el número creciente de cepas que son resistentes a múltiples antibióticos, incluyendo meticilina. También se ha desarrollado recientemente resistencia a vancomicina, un antibiótico de último recurso. La prevención de enfermedad es por lo tanto la mejor manera de limitar la morbilidad y mortalidad provocada por este organismo tanto en seres humanos como en animales. Dado que las vacunas vivas de células completas o muertas en gran medida no consiguen generar respuestas inmunitarias protectoras, se han ensayado inmunizaciones alternativas tales como:

Inmunizaciones activas:

- Los polisacáridos capsulares actúan como factores de virulencia reduciendo la capacidad de los neutrófilos polimorfonucleares hospedadores para opsonizar las bacterias. Aunque se han identificado 12 polisacáridos capsulares de *S. aureus*, los tipos 5 y 8 han explicado históricamente la mayoría de las enfermedades de *S. aureus*. Se desarrolla una vacuna que contiene polisacáridos del tipo 5 y 8 (StaphVAX, Nabi Biopharmaceuticals). Su capacidad protectora se ha demostrado en un modelo de ratón. También se ha mostrado que son seguros e inmunogénicos en seres humanos. Aunque es la única vacuna estafilocócica hasta la fecha que se ha ensayado en un ensayo clínico de Fase III, no ha conseguido cumplir los objetivos de estos ensayos clínicos de Fase III.

- Se ha mostrado que la inmunización con poli N-acetilglucosamina, un carbohidrato de superficie de *S. aureus* sintetizado por productos de icaABC, protege a los ratones contra enfermedad estafilocócica.

- Las vacunas subunitarias compuestas de proteínas de superficie individuales, por ejemplo, factor de aglutinación A (ClfA), factor de aglutinación B (ClfB), determinante de superficie regulado por hierro B (IsdB), o proteína de unión a fibronectina (FnBP), generan respuestas inmunitarias que proporcionan protección parcial contra la exposición a *S. aureus* de animales experimentales.

Inmunizaciones pasivas:

Se están ensayando en la actualidad anticuerpos monoclonales con respecto a su capacidad para interferir con infecciones estafilocócicas. Actualmente está en ensayos clínicos una formulación que contiene altos niveles de anticuerpos de opsonización contra polisacárido capsular de *S. aureus* de tipos 5 y 8 (Altastaph™, Nabi Biopharmaceuticals).

El ácido teicoico es un polímero expresado en la superficie de *S. aureus* que está presente en dos formas: ácido walteicoico (WTA), un componente importante de la pared celular estafilocócica, y ácido lipoteicoico (LTA), que está conectado con la membrana celular. Se está ensayando en la actualidad un anticuerpo anti LTA monoclonal con respecto a su capacidad para prevenir la septicemia estafilocócica negativa para coagulasa. Un estudio controlado por placebo, de doble ciego, de fase I/II del anticuerpo monoclonal anti LTA demostró que el anticuerpo es seguro y tolerable en niños prematuros y muestra farmacocinética lineal. No se han indicado ensayos de eficacia.

El veronato, una inmunoterapia pasiva desarrollada por Inhibitex, se basa en los anticuerpos monoclonales humanizados que reconocen la proteína ClfA de *S. aureus* y SdrG de *S. epidermidis*. Estos anticuerpos monoclonales muestran alguna eficacia protectora en modelos animales de infección por *S. aureus*.

El documento WO2007/145689 A1 se refiere a vacunas que comprenden una toxina alfa de *S. aureus* y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en las que el antígeno de toxina alfa de *S. aureus* puede contener al menos dos alteraciones que reducen su toxicidad y/o pueden conjugarse o coadministrarse con otro antígeno bacteriano. Las vacunas pueden comprender uno o más antígenos bacterianos adicionales. De acuerdo con el documento WO2007/145689 se usa proteína hemolisina alfa sola como antígeno y/o se conjuga químicamente con otros antígenos de *S. aureus*. Sin embargo, la desventaja de proteínas conjugadas es que la reticulación comprometerá la estructura, actividad, inmunogenicidad y antigenicidad. Además, cada componente proteico para mezclar entre sí o para conjugar tiene un historial de purificación diferente debido a diferentes propiedades físico químicas, tiene un grado de pureza diferente, y posiblemente tiene impurezas diferentes. Además, es difícil controlar la estequiometría de la conjugación química entre las diferentes proteínas lo que conduce a un problema de heterogeneidad en la solución proteica. Por lo tanto, es difícil mantener la misma calidad de diferentes cargas. Además, la conjugación de proteínas da como resultado una mezcla de diferentes productos que no pueden definirse de forma apropiada.

El objetivo de la presente invención ha sido desarrollar una herramienta versátil que permita:

- (i) sobreproducir polipéptidos difíciles de expresar;
- 5 (ii) presentar simultáneamente de uno a varios polipéptidos heterólogos en una proteína única;
- (iii) diseñar nuevos antígenos multivalentes que pueden usarse en preparaciones de vacunas, particularmente para tratamiento preventivo y/o terapéutico de enfermedades provocadas por *Staphylococcus*;
- 10 (iv) diseñar nuevos antígenos multivalentes que podrían usarse como fuentes antigénicas para desarrollos de anticuerpos;
- (v) inducir la producción de anticuerpos contra polipéptidos heterólogos correspondientes a epítopos nativos y/o mimótopos.
- 15 (vi) proporcionar un sistema para una inmovilización orientada de proteínas en la superficie de liposomas o cualquier tipo de capas lipídicas, para estudiar interacciones proteicas usando diversas técnicas tales como ELISA, Biacore, Biosensor.
- 20 (vii) proporcionar una proteína definida por ejemplo para su uso como un medicamento o vacuna, que puede prepararse esencialmente en la misma pureza y calidad.

25 El documento WO 99/05167 desvela derivados de hemolisina alfa monocatenarios recombinantes que tienen sustituciones de aminoácidos en la región del tallo, para unir iones metálicos bivalentes, por ejemplo Zn^{2+} . La presencia de iones de Zn altera la conductividad del canal respectivo. Los ensamblajes de canal heptamérico de dichas construcciones mutantes con o sin polipéptidos de tipo silvestre aún forman canales. Dado que estos ensamblajes de canal heptamérico aún forman un canal también está presente la actividad hemolítica.

30 El objetivo de la presente invención se consigue con un polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante de *Staphylococcus aureus*, que tiene una delección en el dominio del tallo para retirar la actividad hemolítica, en el que al menos una secuencia heteróloga está insertada en una región seleccionada del grupo que consiste en regiones definidas por la posición de aminoácidos 108 a 151 (sitio 1), posición de aminoácidos 1 a 5 (sitio 2), posición de aminoácidos 288 a 293 (sitio 3), posición de aminoácidos 43 a 48 (sitio 4), posición de aminoácidos 235 a 240 (sitio 5), posición de aminoácidos 92 a 97 (sitio 6), posición de aminoácidos 31 a 36 (sitio 7), posición de aminoácidos 156 a 161 (sitio 8) con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1, a condición de que, si la secuencia heteróloga contiene cinco o más restos de histidina consecutivos el grupo de la secuencia heteróloga distinto del grupo representado por dichos cinco o más restos de histidina consecutivos tiene una longitud mínima de 11 restos de aminoácidos.

40 La presente invención también se resuelve mediante una variante de dicho polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante, en el que además de dicha delección en el dominio del tallo y dicha inserción de secuencia heteróloga, se añaden, sustituyen o suprimen de uno a cincuenta restos de aminoácidos con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1 y tiene la actividad para formar oligómeros y para unirse con bicapas lipídicas, incluyendo monocapas lipídicas y bicapas lipídicas, o membranas celulares.

45 La delección en el dominio del tallo o la inserción de secuencias heterólogas en los sitios de inserción mencionados no anulan la actividad para formar oligómeros o para unirse con capas lipídicas, incluyendo monocapas lipídicas y bicapas lipídicas, o membranas celulares.

50 Si la secuencia heteróloga contiene cinco o más restos de histidina consecutivos el grupo de la secuencia heteróloga distinto del grupo representado por dichos cinco o más restos de histidina consecutivos tiene una longitud mínima de preferentemente 15, más preferentemente 20, más preferentemente 25 restos de aminoácidos.

55 En realizaciones preferidas adicionales se proporciona una variante de dicho polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante preferentemente, en el que se añaden, sustituyen o suprimen de 1 a 40 restos de aminoácidos, preferentemente de 1 a 25 restos de aminoácidos, más preferentemente de 1 a 20 restos de aminoácidos, más preferentemente de 1 a 15 restos de aminoácidos, aún más preferentemente de 1 a 10 restos de aminoácidos, más preferentemente de 1 a 5 restos de aminoácidos con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1, además de dicha delección en el dominio del tallo y dicha inserción de secuencia heteróloga y tiene la actividad para formar oligómeros y para unirse con capas lipídicas, incluyendo monocapas lipídicas y bicapas lipídicas, o membranas celulares.

60 Una realización preferida adicional de la presente invención es que el polipéptido de hemolisina alfa comprenda al menos una secuencia heteróloga insertada en una región seleccionada del grupo que consiste en regiones definidas por la posición de aminoácidos 108 a 151 (sitio 1), posición de aminoácidos 43 a 48 (sitio 4), posición de aminoácidos 235 a 240 (sitio 5), posición de aminoácidos 92 a 97 (sitio 6), posición de aminoácidos 31 a 36 (sitio 7),

posición de aminoácidos 156 a 161 (sitio 8) con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1. Además de dicha inserción el polipéptido de hemolisina alfa recombinante puede tener al menos una secuencia heteróloga adicional insertada en una región definida por la posición de aminoácidos 1 a 5 (sitio 2) y/o la posición de aminoácidos 288 a 293 (sitio 3) con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1.

5 En una realización preferida adicional más el polipéptido de hemolisina alfa comprende al menos una secuencia heteróloga insertada en una región definida por la posición de aminoácidos 108 a 151 (sitio 1) con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1. Además de dicha inserción el polipéptido de hemolisina alfa recombinante puede tener al menos una secuencia heteróloga adicional insertada en una región seleccionada del grupo que
10 consiste en regiones definidas por la posición de aminoácidos 1 a 5 (sitio 2), posición de aminoácidos 288 a 293 (sitio 3), posición de aminoácidos 43 a 48 (sitio 4), posición de aminoácidos 235 a 240 (sitio 5), posición de aminoácidos 92 a 97 (sitio 6), posición de aminoácidos 31 a 36 (sitio 7), posición de aminoácidos 156 a 161 (sitio 8) con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1.

15 Como se ha mencionado anteriormente, el polipéptido de hemolisina alfa recombinante de acuerdo con la invención tiene una delección en el dominio del tallo: esta delección en el dominio del tallo cumple el fin de anular la toxicidad de la hemolisina alfa y se consigue por ello que el polipéptido no forme ya un poro en la membrana celular. El dominio del tallo queda dentro de la secuencia de aminoácidos de Thr109 a Gln150 con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1. En una realización preferida la secuencia de aminoácidos de Thr109 a Gln150 con respecto a
20 la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1 se retira parcial o completamente. Se prefiere adicionalmente que la secuencia de aminoácidos de Thr109 a Gln150 con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1 se retire completamente.

25 Se prefiere además que la región (Thr109 a Gln150) que incluye la región del tallo (K110 a Y148) y algunos aminoácidos de la región triangular, se hayan sustituido con el tripéptido PGN (véase tabla 1). La secuencia de nucleótidos del tripéptido se usa para crear un sitio de inserción de polipéptido heterólogos en la secuencia nucleotídica del gen codificante de hemolisina alfa. Como resultado, la proteína pierde su actividad hemolítica. La región Thr109 a Gln150 de hemolisina alfa es muy adecuada para inserción y presentación de polipéptidos grandes. Esto se debe a que la sustitución de esta región no daña las otras actividades biológicas de la proteína (plegamiento
30 correcto, unión con capa lipídica, formación de oligómeros). Con respecto a la estructura tridimensional, los presentes inventores descubrieron que el dominio del tallo y por lo tanto el sitio de inserción están flanqueados con un enlazador natural que se corresponde con la región triangular. Esta región separa el núcleo de la proteína del dominio del tallo de modo que tengan un plegamiento que es independiente entre sí. Esto explica por qué la inserción de polipéptidos que tienen un tamaño mayor que el dominio del tallo aún es permisiva (por ejemplo véanse los resultados con PBP2a [SEC ID N°: 10] y ClfA [SEC ID N°: 14]). Ningún dato previo describe esta característica.

35 En una realización preferida de la presente invención la secuencia heteróloga tiene una longitud mínima de 5 restos de aminoácidos, preferentemente al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 300 restos de aminoácidos.

40 En una realización preferida adicional de la presente invención la secuencia heteróloga tiene una longitud máxima de 3000 restos de aminoácidos, preferentemente una longitud máxima de 2000, más preferentemente una longitud máxima de 1500, aún más preferentemente una longitud máxima de 1000, aún más preferentemente una longitud máxima de 500, más preferentemente una longitud máxima de 250 y más preferentemente una longitud máxima de
45 100 restos de aminoácidos.

De acuerdo con una realización preferida adicional de la presente invención el polipéptido de hemolisina alfa recombinante comprende al menos dos secuencias heterólogas insertadas en los mismos de dichos sitios de inserción o insertadas en sitios diferentes de dichos sitios de inserción. Esto significa que cada una de dos o más
50 secuencias heterólogas se insertan por separado en los sitios de inserción proporcionados. Como alternativa, también pueden disponerse dos o más secuencias heterólogas de forma consecutiva e insertarse en los sitios de inserción proporcionados. Las dos o más secuencias heterólogas insertadas en los mismos o diferentes sitios de inserción pueden ser la misma secuencia o diferente. Preferentemente, cada una de las dos o más secuencias heterólogas diferentes entre sí se insertan por separado en los sitios de inserción proporcionados. Como alternativa
55 también pueden disponerse dos o más secuencias heterólogas diferentes entre sí de forma consecutiva e insertarse en los sitios de inserción proporcionados.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia heteróloga" se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos distinta de la secuencia de hemolisina alfa. La "secuencia heteróloga" o las "secuencias heterólogas" pueden ser de cualquier origen incluyendo virus, bacterias, plantas, hongos, parásitos, animales o seres humanos o incluso una secuencia artificial arbitraria. La secuencia heteróloga podría corresponder a epítomos de linfocitos B o linfocitos T. También incluye mimótopos, péptidos que imitan la estructura de un epítomo. Debido a esta propiedad provoca una respuesta de anticuerpo idéntica a la inducida por el epítomo nativo. En este caso, el epítomo nativo también podría corresponder a macromoléculas que no están relacionadas con la proteína tal como peptidoglucano,
65 ácido teicoico, polisacárido capsular.

En una realización particularmente preferida la secuencia heteróloga o las secuencias heterólogas derivan exclusivamente de especies de *Staphylococcus*, preferentemente *Staphylococcus aureus*.

El genoma de *S. aureus* está compuesto de genes centrales y auxiliares que codifican proteínas secretadas, peptidoglucano y proteínas ancladas a membrana y proteínas citoplasmáticas. La mayoría de los genes que comprenden el genoma central son los asociados con el metabolismo central y otras funciones constitutivas de la vida vegetativa de las bacterias, tales como replicación de ADN, síntesis proteica y metabolismo de carbohidratos. Hay genes auxiliares que complementan estas que no son esenciales para el crecimiento y la supervivencia, incluyendo genes de virulencia. La mayoría de los genes de virulencia son:

(i) Proteínas de unión a superficie, varias de estas proteínas relacionadas se unen con moléculas de la matriz extracelular y se han designado MSCRAMM para componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesiva (por ejemplo factores de aglutinamiento, proteínas de unión a fibronectina, proteínas de unión a colágeno y proteínas de unión a sialoproteína del hueso).

(ii) Factores de virulencia implicados en evitar y/o destruir las defensas del hospedador tales como Leucocidinas (por ejemplo, PVL y toxina γ), polisacáridos capsulares (por ejemplo, 5 y 8), proteína A, proteína de adherencia Extracelular (Eap).

(iii) Factores de virulencia implicados en la invasión tisular y/o penetración tales como proteasas, lipasas, nucleasas, hialuronato liasa, fosfolipasa C y metaloproteasas.

(iv) Factores de virulencia implicados en enfermedad mediada por toxina y/o septicemia tales como enterotoxinas, toxina del síndrome de choque tóxico 1, toxinas exfoliantes A y B, toxina α .

(v) Factores de virulencia implicados en la persistencia tales como acumulación de biopelícula, variantes de colonias pequeñas.

(vi) Factores de virulencia implicados en el mecanismo de resistencia a antibióticos tales como β lactamasa, proteína de unión a penicilina resistente PBP2a.

(vii) Mimótopos correspondientes a diversos antígenos estafilocócicos, incluyendo peptidoglucano, ácido teicoico, ácido lipoteicoico y polisacáridos capsulares.

Un mimótopo es una macromolécula, con frecuencia un péptido, que imita la estructura de un epítipo antigénico. Cuando se aplican para inmunizaciones inducen especificidades de anticuerpo deseadas exclusivamente basándose en el principio de la mimesis molecular. El concepto de mimótopo no proporciona solamente una pista para analizar el epítipo de antígeno, sino que también presenta un nuevo modo de desarrollar una vacuna. El mimótopo representa habitualmente una estructura polipeptídica que puede imitar un epítipo antigénico y tiene una reaccionogenicidad similar a la del antígeno nativo. Cuando el mimótopo se conjuga con un vehículo adecuado, puede mostrar inmunogenicidad similar (el antígeno nativo puede no comprender una secuencia o estructura espacial idéntica o similar). Los estudios de algunos antígenos que son difíciles de obtener o identificar apenas pueden realizarse, debido a que sus epítipos antigénicos apenas pueden determinarse, pero este problema puede resolverse obteniendo sus mimótopos. El mimótopo proporciona una pista para analizar el epítipo antigénico y proporciona un nuevo modo de desarrollar una vacuna; además, promueve la investigación de epítipos conformacionales y epítipos antígenos no proteicos.

Más preferentemente, la secuencia heteróloga o secuencias heterólogas se seleccionan del grupo que consiste en SEB (enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*), TSST (toxina de síndrome de choque tóxico), FnBP (proteína de unión a fibronectina), BlaZ (β lactamasa), CifA (Factor de Aglutinamiento A), PBP2a (proteína de unión a penicilina 2a), Proteína A, todas derivadas de especies de *Staphylococcus*, preferentemente *Staphylococcus aureus*.

En otra realización particularmente preferida más la secuencia heteróloga o las secuencias heterólogas se seleccionan de secuencias SEC ID N°: 7 a 18 (véase tabla 2).

Además, la presente invención proporciona los polipéptidos de hemolisina alfa recombinantes de acuerdo con la tabla 3.

En una realización particularmente preferida adicional la secuencia heteróloga comprende un fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A de especies de *Staphylococcus*, preferentemente de *Staphylococcus aureus*; en el que dicho fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A tiene un tamaño mínimo de 5 restos de aminoácidos y no tiene actividad de unión o tiene actividad de unión reducida con el dominio Fc o Fab de la inmunoglobulina G en comparación con la proteína A de longitud completa. En una realización preferida de la presente invención, el fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A tiene una longitud mínima de 5 restos de aminoácidos, preferentemente al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 restos de aminoácidos.

En una realización preferida adicional de la invención el fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A tiene una longitud de 5 a 35 restos de aminoácidos, preferentemente de 5 a 30 restos de aminoácidos, más preferentemente de 10 a 30 restos de aminoácidos y aún más preferentemente de 10 a 25 restos de aminoácidos.

Más preferentemente, el fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A abarca no más de dos hélices alfa completas.

En una realización preferida adicional de la presente invención dicho fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A no tiene actividad de unión o tiene actividad de unión reducida con Fc y no tiene actividad de unión o tiene actividad de unión reducida con el dominio Fab de la inmunoglobulina G en comparación con la proteína A de longitud completa. En una realización particularmente preferida de la presente invención dicho fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A no tiene actividad de unión significativa con Fc y no tiene actividad de unión significativa con el dominio Fab de inmunoglobulina G.

La selección de un cierto tamaño limitado del fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A asegura que el fragmento no tenga una actividad de unión a Fab o Fc significativa. Como se ha mencionado anteriormente, la actividad de unión de los dominios de unión a inmunoglobulina G de proteína A requiere la presencia de las tres hélices alfa (hélice 1, hélice 2 y hélice 3). Para el fin de desarrollar una vacuna contra *Staphylococcus* el fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A no tendrá actividad de unión a Fab o Fc significativa. El experto en la materia podrá elegir fragmentos de dominios de unión a inmunoglobulina G de proteína A para inserción en la molécula de HA destoxificada de modo que dicho fragmento no tenga actividad de unión a Fab o Fc significativa, por ejemplo, eligiendo un fragmento que abarque no más de una o dos hélices completas del plegamiento de haz de tres hélices (hélice 1, hélice 2 y hélice 3).

En una realización preferida adicional el fragmento de dominios de unión a inmunoglobulina G de proteína A comprende la secuencia de no más de una hélice completa seleccionada de hélice 1, hélice 2 y hélice 3 de los dominios de unión a inmunoglobulina G (IgG) E, D, A, B y C.

En otra realización particularmente preferida más el fragmento de proteína A se selecciona de las secuencias SEC ID N°: 16 a 18 (véase tabla 2).

De acuerdo con una realización preferida el resto de hemolisina alfa del polipéptido recombinante de la presente invención tiene la secuencia SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 5 (ICHA I, ICHA II). Además, se comprenden variantes de dicho polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante en las que el resto de hemolisina alfa tiene 80 % o más, preferentemente 85 % o más, más preferentemente 90 %, más preferentemente 95 % o más identidad de aminoácidos con respecto a las secuencias SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 5.

La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica el polipéptido de hemolisina alfa recombinante anteriormente descrito de acuerdo con la presente invención. Se proporciona además un vector que comprende dicho polinucleótido que codifica el polipéptido de hemolisina alfa recombinante anteriormente descrito. También se proporciona un transformante que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido de hemolisina alfa recombinante anteriormente descrito o el vector que comprende dicho polinucleótido que codifica el polipéptido de hemolisina alfa recombinante anteriormente descrito.

El polipéptido recombinante puede usarse en prevención y/o terapia, particularmente de enfermedades provocadas por especies de *Staphylococcus*, particularmente de *Staphylococcus aureus*. El polinucleótido o el vector como se ha mencionado anteriormente puede usarse en vacunación de ADN.

El objetivo también se consigue con un medicamento o vacuna que comprende un polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante de *Staphylococcus aureus*, que tiene una delección en el dominio del tallo para eliminar la actividad hemolítica, en el que al menos una secuencia heteróloga se inserta en un bucle expuesto al disolvente del polipéptido de hemolisina alfa, en el que la secuencia heteróloga o las secuencias heterólogas se seleccionan de especies de *Staphylococcus*, preferentemente *Staphylococcus aureus*. La secuencia heteróloga o las secuencias heterólogas se seleccionan de las proteínas constitutivas, factores de virulencia (proteínas citoplasmáticas, secretadas y ancladas a la membrana citoplasmática o peptidoglucano) y mimótopos correspondientes a diversos antígenos Estafilocócicos, incluyendo peptidoglucano, ácido teicoico, ácido lipoteicoico y polisacáridos capsulares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "bucle expuesto a disolvente" significa que la parte respectiva de la secuencia de aminoácidos de polipéptido de hemolisina alfa, que forma un bucle, se expone a y es accesible desde un medio acuoso o fluidos biológicos tales como sangre.

En una realización preferida de los medicamentos o vacuna la secuencia heteróloga o las secuencias heterólogas se seleccionan del grupo que consiste en SEB (enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*), TSST (toxina del síndrome de choque tóxico), FnBP (proteína de unión a fibronectina), BlaZ (β lactamasa), ClfA (Factor de Aglutinamiento A), PBP2a (proteína de unión a penicilina 2a), Proteína A, todas derivadas de especies de *Staphylococcus*, preferentemente *Staphylococcus aureus*.

En una realización preferida del medicamento o vacuna la secuencia heteróloga se inserta en una región seleccionada del grupo que consiste en regiones definidas por la posición de aminoácidos 108 a 151 (sitio 1), posición de aminoácidos 1 a 5 (sitio 2), posición de aminoácidos 288 a 293 (sitio 3), posición de aminoácidos 43 a 48

(sitio 4), posición de aminoácidos 235 a 240 (sitio 5), posición de aminoácidos 92 a 97 (sitio 6), posición de aminoácidos 31 a 36 (sitio 7), posición de aminoácidos 156 a 161 (sitio 8), preferentemente en una región definida por la posición de aminoácidos 108 a 151, con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1.

5 En otra realización particularmente preferida más del medicamento o vacuna la secuencia heteróloga o las secuencias heterólogas se seleccionan de las secuencias SEC ID N°: 7 a 18 (véase tabla 2). Se prefiere que al menos 2, preferentemente al menos 3, más preferentemente al menos 4 secuencias heterólogas diferentes se seleccionen de las secuencias SEC ID N°: 7 a 18.

10 Además, en una realización particularmente preferida adicional el medicamento o vacuna comprende un polipéptido de hemolisina alfa recombinante seleccionado del grupo como se muestra en la tabla 3.

15 Como se ha mencionado anteriormente, el polipéptido de hemolisina alfa recombinante de acuerdo con la invención comprendido en el medicamento o vacuna tiene una deleción en el dominio del tallo, concretamente dentro de la secuencia de aminoácidos de Thr109 a Gln150 con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1. En una realización preferida la secuencia de aminoácidos de Thr109 a Gln150 con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1 se retira parcial o completamente. Más preferentemente, la secuencia de aminoácidos de Thr109 a Gln150 con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1 se retira completamente.

20 De acuerdo con una realización preferida del medicamento o vacuna el resto de hemolisina alfa del polipéptido recombinante de la presente invención tiene la secuencia SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 5 (ICHA I, ICHA II). Además, están comprendidas variantes de dicho polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante en las que el resto de hemolisina alfa tiene 80 % o más, preferentemente 85 % o más, más preferentemente 90 %, más preferentemente 95 % o más identidad de aminoácidos con respecto a las secuencias SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 5.

25 Una realización preferida del medicamento o vacuna tiene la condición de que, si la secuencia heteróloga contiene cinco o más restos de histidina consecutivos el grupo de la secuencia heteróloga distinto del grupo representado por dichos cinco o más restos de histidina consecutivos tienen longitud mínima de 11 restos de aminoácidos.

30 Si la secuencia heteróloga contiene cinco o más restos de histidina consecutivos el grupo de la secuencia heteróloga distinto del grupo representado por dichos cinco o más restos de histidina consecutivos tiene una longitud mínima de preferentemente 15, más preferentemente 20, más preferentemente 25 restos de aminoácidos.

35 El polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante comprendido en el medicamento o vacuna de acuerdo con la invención puede comprender una cualquiera de las características descritas anteriormente para el polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante.

40 El medicamento o vacuna también puede comprender una variante de dicho polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante, en el que además de dicha deleción en el dominio de tallo y dicha inserción de secuencia heteróloga, se añaden, sustituyen o suprimen de 1 a 50 restos de aminoácidos con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1 y tiene la actividad para formar oligómeros y para unirse con capas lipídicas, incluyendo monocapas lipídicas y bicapas lipídicas, o membranas celulares. En una realización preferida adicional la variante de dicho polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante preferentemente tiene de 1 a 40, más preferentemente de 1 a 25 restos de aminoácidos, aún más preferentemente de 1 a 20 restos de aminoácidos, aún más preferentemente de 1 a 15 restos de aminoácidos, particularmente preferentemente de 1 a 10 restos de aminoácidos y más preferentemente de 1 a 5 restos de aminoácidos, que se añaden, sustituyen o suprimen con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1, además de dicha deleción en el dominio del tallo y dicha inserción de la secuencia heteróloga y tiene la actividad para formar oligómeros y para unirse con capas lipídicas, incluyendo monocapas lipídicas y bicapas lipídicas, o membranas celulares.

50 La síntesis de una vacuna multivalente como una única proteína usando un antígeno del patógeno diana como una proteína vehículo es ventajosa para prevenir la patogénesis de agentes infecciosos complejos tales como *S. aureus* induciendo respuestas inmunitarias celulares y/o humorales.

55 El polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante de acuerdo con la invención puede usarse para la preparación de anticuerpos. Cuando se usa el polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante para la preparación de anticuerpos, preferentemente se obtiene una mezcla de anticuerpos que comprende anticuerpos dirigidos a hemolisina alfa y anticuerpos dirigidos a la secuencia o las secuencias heterólogas respectivas. En caso de que se desee una inmunización pasiva con una mezcla de anticuerpos contra una enfermedad provocada por *Staphylococcus* la secuencia o las secuencias heterólogas derivan todas de *Staphylococcus*.

60 En un método alternativo los anticuerpos dirigidos a diferentes antígenos pueden separarse. Además, también pueden prepararse anticuerpos monoclonales de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

65 El polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante de acuerdo con la presente invención también puede

usarse en ensayos para detectar y/o seleccionar un agente que se une con la secuencia heteróloga, preferentemente para detectar anticuerpos dirigidos a la secuencia heteróloga. El polipéptido recombinante es adecuado por lo tanto para explorar con respecto a ligandos, por ejemplo productos químicos finos, péptidos o proteínas, que se unen con la secuencia heteróloga. El polipéptido recombinante también es adecuado para mapeo de epítomos. Una aplicación adicional es el uso del polipéptido recombinante para detectar anticuerpos en una muestra, por ejemplo muestra de sangre o suero, dirigiéndose dichos anticuerpos a la secuencia heteróloga. En dicho ensayo el polipéptido de hemolisina alfa recombinante de acuerdo con la presente invención puede unirse con un liposoma que está unido con un soporte sólido. La unión del liposoma con un soporte sólido puede conseguirse preferentemente por unión de avidina/estreptavidina. Un soporte sólido adecuado puede ser la superficie de un pocillo de una placa multipocillo.

Las ventajas del polipéptido recombinante de acuerdo con la presente invención son que:

(i) Pueden reproducirse polipéptidos que son difíciles de expresar.

(ii) Pueden presentarse de uno a varios polipéptidos heterólogos simultáneamente en una única proteína; en la que la presentación se realiza en fusión y en bucles expuestos a disolvente de una proteína vehículo (hemolisina alfa de acuerdo con la invención).

(iii) Pueden diseñarse antígenos multivalentes que pueden usarse en preparaciones de vacuna, particularmente para el tratamiento preventivo y/o terapéutico de enfermedades provocadas por *Staphylococcus*.

(iv) Pueden diseñarse antígenos multivalentes que pueden usarse como fuentes antigénicas para el desarrollo y preparación de anticuerpos.

(v) Puede inducirse producción de anticuerpos contra polipéptidos heterólogos correspondientes a epítomos nativos y/o mimótopos.

(vi) Se proporciona un sistema para una inmovilización orientada de proteínas en la superficie de liposomas o cualquier tipo de capas lipídicas, para estudiar interacciones proteicas usando diversas técnicas tales como ELISA, Biacore, Biosensor. La inmovilización de proteínas en la superficie de liposomas se debe a la interacción del resto vehículo (hemolisina alfa) con capa lipídica tal como liposomas. Este sistema también es prometedor cuando se usa adyuvante liposómico en vacunología y desarrollos de anticuerpos.

Además, el polipéptido recombinante de la presente invención puede usarse para presentación de bibliotecas de fragmentos proteicos aleatorios. El dominio parental (hemolisina alfa como se construye de acuerdo con la presente invención) puede actuar como un armazón para presentar bibliotecas de fragmentos proteicos aleatorios. Se espera que la proteína heteróloga o fragmentos polipeptídicos estén restringidos conformacionalmente, estabilizados y protegidos contra proteólisis. Usando presentación de fagos, presentación bacteriana, presentación de ribosomas y presentación de levadura, este enfoque puede usarse para realizar bibliotecas de fragmentos antigénicos y mapear epítomos reconocidos por anticuerpos monoclonales y policlonales. El polipéptido recombinante de la presente invención constituye una herramienta original no solamente para el mapeo de epítomos sino también en el desarrollo de inmunoensayos.

Además, el polipéptido de hemolisina alfa recombinante como una proteína monocatenaria es menos costoso de fabricar y tiene la ventaja de un proceso de producción práctico y ensayos de control de calidad más sencillos que una vacuna consistente en varias proteínas recombinantes. Por lo tanto, el polipéptido de hemolisina alfa recombinante es particularmente útil como medicamento y vacuna.

Una realización alternativa de la presente invención se refiere a un polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante de *Staphylococcus aureus*, que tiene una delección en el dominio del tallo para eliminar la actividad hemolítica, que contiene un fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A de especies de *Staphylococcus*, preferentemente de *Staphylococcus aureus* insertado en un sitio permisivo. Como se explica a continuación dicho fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A tiene un tamaño mínimo de 5 restos de aminoácidos y no tiene actividad de unión o tiene actividad de unión reducida con el dominio Fc o Fab de inmunoglobulina G en comparación con la proteína A de longitud completa.

La proteína estafilocócica A (SpA) desempeña un papel clave en la patogenia de *S. aureus*. SpA es una proteína de 42 kDa y comprende varias regiones con diferentes funciones (Figura 14): la región de repetición Wr, que se usa para tipación de *spa*, la región Wc, que confiere anclaje a la pared celular bacteriana, la secuencia señal (región S) en la parte N terminal y los cuatro o cinco dominios de unión a inmunoglobulina G (IgG) altamente homólogos, designados E, D, A, B y C que comparten el 65 - 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos (Figura 15). El dominio Z de SpA presentado en la bibliografía es un análogo modificado por ingeniería genética del dominio de unión a IgG B. El tamaño de estos dominios es relativamente pequeño; cada uno contiene aproximadamente 58 restos de aminoácidos. Las estructuras de solución de dos de estos dominios, los dominios B y E, así como el dominio Z muy similar, se han determinado por espectroscopia de RMN. Estos análisis estructurales revelaron que

5 estos dominios de unión a IgG adoptaron un plegamiento de haz de tres hélices “arriba-abajo” clásico. Los estudios de cristalografía y RMN indicaron que la hélice 1 y la hélice 2 interaccionan con la parte Fc de Ig mientras que la hélice 2 y la hélice 3 se unen con el dominio Fab de Ig. Estos estudios también indicaron que la actividad de unión de los dominios de unión a Ig SpA requiere la presencia de las tres hélices y depende de su estructura tridimensional.

10 La actividad de unión de SpA actúa para cubrir la célula bacteriana con IgG, bloqueando de este modo cualquier interacción con receptores de Fc en neutrófilos y dificultando la fagocitosis. Además de unirse con la región Fc de IgG, cada dominio SpA individual también interacciona con fragmentos Fab VH3 de muchas moléculas IgM, IgA, IgG e IgE por medio de la cadena pesada, aunque esta no interfiere con el sitio de unión a antígeno del anticuerpo. Debido a esta capacidad para unirse con Fab, SpA actúa como un superantígeno de linfocitos B, que induce proliferación y posterior agotamiento del repertorio de linfocitos B. IgG unida a SpA también inhibe la fijación de complemento por la ruta clásica.

15 El uso de SpA como candidato para una vacuna contra las infecciones por *S. aureus* nunca se ha usado en el pasado. Los problemas relacionados con el uso de SpA en una preparación de vacuna se relacionan con la capacidad de SpA para unirse con la parte Fc de inmunoglobulinas y de este modo escapar al sistema inmunitario y provocar un agotamiento del repertorio de linfocitos B. Los ensayos de inmunización realizados por los presentes inventores usando ICHA I 009 confirmaron que la presentación de un dominio de unión a IgG funcional de SpA en ICHA no desencadenaba la inducción de anticuerpos anti SpA (datos no mostrados).

20 Otro problema relacionado con el uso del dominio de unión a Ig SpA funcional en vacuna humana es el riesgo de provocar una respuesta antiidiotípica que se caracteriza por la aparición de autoanticuerpos. Esto se produce cuando el parátipo de los anticuerpos anti SpA estimula el sistema inmunitario para generar anticuerpos secundarios que presentan un parátipo que imita las propiedades estructurales y biológicas del antígeno.

25 Los anticuerpos antiidiotípicos reconocen los determinantes idiotípicos (parátipos) expresados en la región variable de un anticuerpo particular o las regiones variables de un grupo de anticuerpos relacionados. Se ha propuesto que los anticuerpos antiidiotípicos se expresan para regular la expresión de anticuerpos que dominan la respuesta a un antígeno particular. La supresión de linfocitos B que expresan estos anticuerpos dominantes permitiría la proliferación de los anticuerpos usando secuencias de región variable alternativas y en última instancia la diversificación de la respuesta de anticuerpos. Aunque la expresión de anticuerpos antiidiotípicos normalmente se reduciría con la expresión reducida de los anticuerpos a los que responden, los anticuerpos antiidiotípicos que reaccionan de forma cruzada con algo tan ubicuo como la auto IgG tiene el potencial de propagarse continuamente.

30 Por lo tanto un objetivo adicional de la presente invención era proporcionar una vacuna basándose en la proteína A que no implique los inconvenientes del estado de la técnica.

35 La presente invención también proporciona por lo tanto un polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante de *Staphylococcus aureus*, que tiene una delección en el dominio del tallo para eliminar la actividad hemolítica, en el que al menos una secuencia heteróloga se inserta en un sitio permisivo, y en el que la secuencia heteróloga comprende un fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A de especies de *Staphylococcus*, preferentemente de *Staphylococcus aureus*; en el que dicho fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A tiene un tamaño mínimo de 5 restos de aminoácidos y no tiene actividad de unión o tiene actividad de unión reducida con el dominio Fc o Fab de inmunoglobulina G en comparación con la proteína A de longitud completa; o una variante de la misma, en la que además de dicha delección en el dominio del tallo y dicha inserción de la secuencia heteróloga, se añaden, sustituyen o suprimen de 1 a 50 restos de aminoácidos con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1 y tiene la actividad para formar oligómeros y para unirse con bicapas lipídicas, incluyendo monocapas lipídicas y bicapas lipídicas, o membranas celulares.

40 En una realización preferida adicional de la presente invención dicho fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A no tiene actividad de unión o tiene actividad de unión reducida con Fc y no tiene actividad de unión o tiene actividad de unión reducida con el dominio Fab de inmunoglobulina G en comparación con la proteína A de longitud completa. En una realización particularmente preferida de la presente invención dicho fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A no tiene actividad de unión significativa con Fc y no tiene actividad de unión significativa con el dominio Fab de inmunoglobulina G.

45 Dado que la capacidad de SpA para interaccionar con la región Fc o la Fab de las moléculas de inmunoglobulina está fuertemente reducida o anulada en el polipéptido de hemolisina alfa recombinante de la presente invención, los inconvenientes anteriormente mencionados pueden superarse y pueden inducirse anticuerpos contra antígenos de *Staphylococcus*, particularmente dirigidos contra antígeno de proteína A de *Staphylococcus*, y los mamíferos pueden vacunarse contra *Staphylococcus* mucho más eficazmente.

50 Como se ha mencionado anteriormente la delección en el dominio del tallo o la inserción de secuencias heterólogas en los sitios de inserción mencionados no anulan la actividad para formar oligómeros o para unirse con capas lipídicas, incluyendo monocapas lipídicas y bicapas lipídicas, o membranas celulares.

En una realización preferida de la presente invención el fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A tiene una longitud mínima de 5 restos de aminoácidos, preferentemente al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 restos de aminoácidos.

En una realización preferida adicional de la invención el fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A tiene una longitud de 5 a 35 restos de aminoácidos, preferentemente de 5 a 30 restos de aminoácidos, más preferentemente de 10 a 30 restos de aminoácidos, y aún más preferentemente de 10 a 25 restos de aminoácidos.

Más preferentemente, el fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A abarca no más de dos hélices alfa completas.

La selección de un cierto tamaño limitado del fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A asegura que el fragmento no tenga una actividad de unión a Fab o Fc significativa. Como se ha mencionado anteriormente, la actividad de unión de los dominios de unión a inmunoglobulina G de la proteína A requiere la presencia de las tres hélices alfa (hélice 1, hélice 2 y hélice 3). Para el fin de desarrollar una vacuna contra *Staphylococcus* el fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A no tendrá actividad de unión a Fab o Fc significativa. El experto en la materia será capaz de seleccionar fragmentos de dominios de unión a inmunoglobulina G de proteína A para inserción en la molécula de HA destoxificada de modo que dicho fragmento no tenga actividad de unión a Fab o Fc significativa, por ejemplo seleccionando un fragmento que abarque no más de una o dos hélices completas del plegamiento de haz de tres hélices (hélice 1, hélice 2 y hélice 3).

En una realización preferida adicional el fragmento de los dominios de unión a inmunoglobulina G de la proteína A comprende la secuencia de no más de una hélice completa seleccionada de hélice 1, hélice 2 y hélice 3 de los dominios de unión a inmunoglobulina G (IgG) E, D, A, B y C.

En otra realización particularmente preferida más el fragmento de la proteína A se selecciona de las secuencias SEC ID N°: 16 a 18 (véase tabla 2).

En otra realización preferida el sitio permisivo se localiza dentro de un bucle expuesto a disolvente, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en regiones definidas por la posición de aminoácidos 108 a 151, posición de aminoácidos 1 a 5, posición de aminoácidos 288 a 293, posición de aminoácidos 43 a 48, posición de aminoácidos 235 a 240, posición de aminoácidos 92 a 97, posición de aminoácidos 31 a 36, posición de aminoácidos 156 a 161 con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1.

Como se usa en el presente documento, la expresión "bucle expuesto a disolvente" significa que la parte respectiva de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de hemolisina alfa, que forma un bucle, se expone a y es accesible desde un medio acuoso o fluidos biológicos tales como sangre.

Una realización preferida adicional de la presente invención es que el sitio permisivo del polipéptido de hemolisina alfa se localiza en una región seleccionada del grupo que consiste en regiones definidas por la posición de aminoácidos 108 a 151 (sitio 1), posición de aminoácidos 43 a 48 (sitio 4), posición de aminoácidos 235 a 240 (sitio 5), posición de aminoácidos 92 a 97 (sitio 6), posición de aminoácidos 31 a 36 (sitio 7), posición de aminoácidos 156 a 161 (sitio 8) con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1.

En una realización aún más preferida, el polipéptido de hemolisina alfa comprende dicha secuencia heteróloga insertada en una región definida por la posición de aminoácidos 108 a 151 (sitio 1) con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1.

Como se ha mencionado anteriormente, el polipéptido de hemolisina alfa recombinante de acuerdo con la invención tiene una delección en el dominio del tallo: esta delección en el dominio del tallo cumple el fin de anular la toxicidad de la hemolisina alfa y se consigue por ello que el polipéptido no forme ya un poro en la membrana celular. El dominio del tallo queda dentro de la secuencia de aminoácidos de Thr109 a Gln150 con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1. En una realización preferida la secuencia de aminoácidos de Thr109 a Gln150 con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1 se retira parcial o completamente. Más preferentemente, la secuencia de aminoácidos de Thr109 a Gln150 con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1 se retira completamente.

Más preferentemente, la región (Thr109 a Gln150) que incluye la región del tallo (K110 a Y148) y algunos aminoácidos de la región triangular, se ha sustituido con el tripéptido PGN (véase tabla 1). La secuencia de nucleótidos del tripéptido se usa para crear un sitio de inserción de polipéptidos heterólogos en la secuencia de nucleótidos del gen codificante de hemolisina alfa. Como resultado, la proteína pierde su actividad hemolítica. La región Thr109 a Gln150 de hemolisina alfa es muy adecuada para inserción y presentación de polipéptidos grandes. Esto se debe a que la sustitución de esta región no daña las otras actividades biológicas de la proteína (plegamiento correcto, unión con capa lipídica, formación de oligómeros). Con respecto a la estructura tridimensional, los

presentes inventores descubrieron que el dominio del tallo y por lo tanto el sitio de inserción están flanqueados con un enlazador natural que corresponde a la región triangular. Esta región separa el núcleo de la proteína del dominio del tallo de modo que tengan un plegamiento que es independiente entre sí.

5 En otra realización preferida más el resto de hemolisina alfa tiene la secuencia SEC ID N°: 3 (ICHA I) o SEC ID N°: 5 (ICHA II), o variantes de las mismas en las que el resto de hemolisina alfa tiene 85 % preferentemente 90 %, más preferentemente 95 % o más identidad de aminoácidos con respecto a las secuencias SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 5.

10 La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica el polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante de *Staphylococcus aureus*, que tiene una delección en el dominio del tallo para retirar la actividad hemolítica, en el que se inserta al menos una secuencia heteróloga en un sitio permisivo, y en el que la secuencia heteróloga comprende un fragmento del dominio de unión a la inmunoglobulina G de la proteína A de especies de *Staphylococcus*, preferentemente de *Staphylococcus aureus*; en el que dicho fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A tiene un tamaño mínimo de 5 restos de aminoácidos y no tiene actividad de unión o tiene actividad de unión reducida con el dominio Fc o Fab de inmunoglobulina G en comparación con la proteína A de longitud completa; o una variante de la misma, en la que además de dicha delección en el dominio del tallo y dicha inserción de secuencia heteróloga, se añaden, sustituyen o suprimen de 1 a 50 restos de aminoácidos con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1 y tiene la actividad para formar oligómeros y para unirse con bicapas lipídicas, incluyendo monocapas lipídicas y bicapas lipídicas, o membranas celulares.

20 La presente invención también se refiere a un vector que comprende dicho polinucleótido y a un transformante que comprende dicho polinucleótido o dicho vector.

25 El polipéptido recombinante puede usarse en prevención y/o terapia provocada por especies de *Staphylococcus* particularmente de *Staphylococcus aureus*. El polinucleótido o el vector como se ha mencionado anteriormente puede usarse en vacunación de ADN.

30 Además, la presente invención proporciona un medicamento o vacuna que comprende un polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante de *Staphylococcus aureus*, que tiene una delección en el dominio del tallo para eliminar la actividad hemolítica como se ha definido anteriormente, en el que al menos una secuencia heteróloga se inserta en un sitio permisivo, y en el que la secuencia heteróloga comprende un fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A de especies de *Staphylococcus*, preferentemente de *Staphylococcus aureus*; en el que dicho fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A tiene un tamaño mínimo de 5 restos de aminoácidos y no tiene actividad de unión o tiene actividad de unión reducida con el dominio Fc o Fab de inmunoglobulina G en comparación con la proteína A de longitud completa; o una variante del mismo, en el que además de dicha delección en el dominio del tallo y dicha inserción de secuencia heteróloga, se añaden, sustituyen o suprimen de 1 a 50 restos de aminoácidos con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1 y tiene la actividad para formar oligómeros y para unirse con bicapas lipídicas, incluyendo monocapas lipídicas y bicapas lipídicas, o membranas celulares.

40 En una realización preferida adicional del medicamento de la presente invención dicho fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A no tiene actividad de unión o tiene actividad de unión reducida con Fc y no tiene actividad de unión o tiene actividad de unión reducida con el dominio Fab de la inmunoglobulina G en comparación con la proteína A de longitud completa. En una realización particularmente preferida de la presente invención dicho fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la proteína A no tiene actividad de unión significativa con Fc y no tiene actividad de unión significativa con el dominio Fab de inmunoglobulina G.

Descripción detallada y definiciones

50 La invención se refiere al desarrollo de una forma modificada por ingeniería genética de la hemolisina alfa (HA) estafilocócica, denominada ICHA por Hemolisina Alfa Transportadora Inactivada. El gen codificante de ICHA se obtuvo por inserción de numerosos sitios de restricción en la secuencia codificante de la Hemolisina Alfa (HA) y por sustitución de la secuencia nucleotídica que codifica el fragmento de HA Thr109-Gln150 con un sitio de restricción adicional. La proteína resultante pierde su actividad hemolítica pero aún es capaz de interactuar con capas lipídicas, formar oligómeros e inducir anticuerpos neutralizadores contra HA. Los sitios de restricción creados en el gen codificante de ICHA corresponden a sitios de inserción permisivos que se usan para presentar al menos un polipéptido heterólogo en la superficie de la proteína vehículo. Los polipéptidos heterólogos pueden presentarse en fusión con ICHA o en ICHA. Los polipéptidos presentados pueden ser péptidos, fragmentos proteicos o proteínas.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia heteróloga" se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos distinta de la secuencia de hemolisina alfa. La "secuencia heteróloga" o "secuencias heterólogas" pueden ser cualquier origen incluyendo virus, bacterias, plantas, hongos, parásitos, animales o seres humanos o incluso una secuencia artificial arbitraria. En una realización particularmente preferida la secuencia heteróloga o las secuencias heterólogas derivan exclusivamente de especies de *Staphylococcus*, preferentemente *Staphylococcus aureus*. La secuencia heteróloga podría corresponderse con epitopos de linfocitos B o linfocitos T. También incluye mimótopos, péptidos que imitan la estructura de un epítipo. Debido a esta propiedad provoca una respuesta de

anticuerpo idéntica a la inducida por el epítipo nativo. En este caso, este epítipo nativo también podría corresponderse con macromoléculas que no están relacionadas con la proteína tales como peptidoglucano, ácido teicoico, ácido lipoteicoico, polisacárido capsular.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión “sitio permisivo” significa que la inserción de una secuencia en dicho sitio permisivo no altera significativamente las características y actividad de la construcción de polipéptido de hemolisina alfa como se define en la presente invención (eliminandose la actividad hemolítica). Aquí el sitio permisivo se localiza preferentemente dentro de un bucle expuesto a disolvente, que más preferentemente se selecciona del grupo que consiste en regiones definidas por la posición de aminoácidos 108 a 151, posición de aminoácidos 1 a 5, posición de aminoácidos 288 a 293, posición de aminoácidos 43 a 48, posición de aminoácidos 235 a 240, posición de aminoácidos 92 a 97, posición de aminoácidos 31 a 36, posición de aminoácidos 156 a 161 con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1.

15 Como se usa en el presente documento la expresión “bucle expuesto a disolvente” significa que la parte respectiva de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de hemolisina alfa, que forma un bucle, se expone a y es accesible desde un medio acuoso o fluidos biológicos tales como sangre.

Producción de los polipéptidos de la invención

20 Los polipéptidos de la presente invención pueden, por ejemplo, producirse usando métodos recombinantes y técnicas conocidas en este campo. Aunque se describen en el presente documento técnicas específicas para su preparación, debe entenderse que se pretende que todas las técnicas apropiadas adecuadas para la producción de estos polipéptidos estén dentro del alcance de la presente invención.

25 Generalmente, estas técnicas incluyen secuenciación de ADN y proteínas, clonación, expresión y otras técnicas de ingeniería recombinante que permiten la construcción de vectores procariotas y eucariotas que codifican y expresan cada uno de los péptidos de la invención.

30 Los polipéptidos de la invención pueden producirse por expresión de un ácido nucleico (polinucleótido) que codifica el polipéptido de interés. La expresión de los polipéptidos codificados puede realizarse en hospedadores bacterianos, de levadura, vegetales, de insectos o mamíferos por técnicas bien conocidas en este campo. Los polipéptidos también podrían obtenerse por síntesis química o por transcripción/traducción *in vitro* usando extractos celulares o proteínas purificadas de las maquinarias de transcripción/traducción.

35 En una realización, un polipéptido de interés de la invención se obtiene clonando la secuencia de ADN en un vector. Se transforma una célula hospedadora con el ácido nucleico modificado para permitir la expresión del polipéptido codificado.

40 Se describen métodos para clonar ADN en un vector y para insertar, suprimir y modificar polinucleótidos y para mutagénesis dirigida, por ejemplo, en *Promega Protocols and Applications Guide*, mencionado anteriormente. Las células o bacterias pueden transfectarse con un vector, preferentemente con un vector de expresión, que tiene la secuencia de ADN deseada unida al mismo, por técnicas conocidas incluyendo choque térmico, electroporación, precipitación con fosfato de calcio y lipofección, entre otras. Los péptidos terminales u otros análogos o fragmentos pueden después extraerse y purificarse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de permeación en gel. Sin embargo, se contempla que otros métodos y técnicas conocidos en este campo para realizar las diferentes etapas o combinaciones de estas etapas necesarias para derivar el péptido de la presente invención o etapas equivalentes están dentro del alcance de la presente invención.

50 Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencias entre dos o más ácidos nucleicos o polinucleótidos: “secuencia de referencia”, “ventana de comparación”, “identidad de secuencia”, “porcentaje de identidad de secuencia” e “identidad sustancial”. Una “secuencia de referencia” es una secuencia definida usada como una base para una comparación de secuencia; una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, por ejemplo, como un segmento de un ADNc de longitud completa o secuencia génica proporcionada en un listado de secuencias, o puede comprender un ADNc completo o secuencia génica.

60 Puede realizarse alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444 (1988), o por implementaciones computarizadas de esos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics Versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI).

65 Como se aplica a los polipéptidos, las expresiones “identidad sustancial” o “identidad de secuencia sustancial” significan que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos el 80 por ciento de identidad de secuencia,

preferentemente al menos 90 por ciento de identidad de secuencia o más. El “porcentaje de identidad de aminoácidos” o “porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos” se refiere a una comparación de los aminoácidos de dos polipéptidos que, cuando se alinean de forma óptima, tienen aproximadamente porcentaje designado de los mismos aminoácidos. Por ejemplo, el “95 % de identidad de aminoácidos” se refiere a una comparación de los aminoácidos de dos polipéptidos que cuando se alinean de forma óptima tienen 95 % de identidad de aminoácidos. Preferentemente, las posiciones de restos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos que tienen propiedades químicas similares tales como carga o polaridad probablemente no afecte a las propiedades de una proteína. Los ejemplos incluyen glutamina por asparagina o ácido glutámico por ácido aspártico.

La frase “sustancialmente purificado” o “aislado” cuando se refiere a un péptido o proteína, significa una composición química que esencialmente no tiene otros componentes celulares. Está preferentemente en un estado homogéneo aunque puede estar en una solución seca o acuosa. La pureza y homogeneidad se determinan normalmente usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. Generalmente, una proteína sustancialmente purificada o aislada comprenderá más del 80 % de todas las especies macromoleculares presentes en la preparación. Preferentemente, la proteína se purifica para representar más del 90 % de todas las especies macromoleculares presentes. Más preferentemente, la proteína se purifica a más del 95 %, y, más preferentemente, la proteína se purifica hasta homogeneidad esencial, en la que no se detectan otras especies macromoleculares por técnicas convencionales.

Ácidos nucleicos de la invención

También se proporcionan en el presente documento ácidos nucleicos aislados que comprenden secuencias de ADN o ARN (polinucleótidos) que codifican los péptidos de la invención. Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender además vectores para expresión de los péptidos de la invención. Se entiende por un experto habitual en la técnica que debido a la degeneración del código genético, pueden realizarse sustituciones en la secuencia de nucleótidos que no dan como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos codificada. Se entiende además por un experto en la materia que ambas cadenas complementarias de cualquier molécula de ADN descrita en el presente documento están incluidas dentro del alcance de la invención.

Como se usa en el presente documento, el término “vector” se refiere a un vehículo hecho de un polinucleótido o que contiene un polinucleótido que puede transferir una secuencia polinucleotídica o gen de interés a una célula diana. El vector puede ser un “vector viral” o un “vector plasmídico” o puede combinar ambas propiedades en una construcción. Los ejemplos de un vector incluyen vectores que son capaces de autorreplicación o capaces de incorporarse en un cromosoma dentro de células hospedadoras (por ejemplo, células procariontas, levadura, células animales, células vegetales, células de insectos, animales completos y plantas completas) y contienen un promotor en un sitio adecuado para transcripción de un polinucleótido o gen.

Como se usa en el presente documento, la expresión “vector de expresión” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende un gen estructural y un promotor para regular la expresión del mismo, y además diversos elementos reguladores en un estado que les permite actuar dentro de células hospedadoras. El elemento regulador puede incluir, preferentemente, terminadores, marcadores seleccionables tales como genes de resistencia a fármacos (por ejemplo, un gen de resistencia a kanamicina, un gen de resistencia a higromicina, etc.) y potenciadores. Se conoce bien por los expertos en la materia que el tipo de organismo, vector de expresión y el tipo de un elemento regulador pueden variar dependiendo de la célula hospedadora.

Como se usa en el presente documento, el término “promotor” se refiere a una secuencia de bases que determina el sitio de inicio de la transcripción de un gen y es una región de ADN que regula directamente la frecuencia de la transcripción. La transcripción se inicia por ARN polimerasa que se une con un promotor.

Como se usa en el presente documento, los términos “transformación”, “transducción” y “transfección” se usan de forma intercambiable a no ser que se mencione de otro modo, y se refieren a la introducción de un ácido nucleico en células hospedadoras. Como un método de transformación, puede usarse cualquier técnica para introducir ADN en células hospedadoras, incluyendo diversas técnicas bien conocidas, tales como, por ejemplo, el método de electroporación, el método de pistola de partículas (pistola génica), el método de fosfato cálcico, y similares.

Como se usa en el presente documento, el término “transformante” se refiere al total o a una parte de un organismo, tal como una célula, que se produce por transformación. Los ejemplos de un transformante incluyen células procariontas, tales como bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*), levadura, células animales, células vegetales, células de insecto y similares. Los transformantes también pueden denominarse células transformadas, tejido transformado, hospedadores transformados, o similares, dependiendo del sujeto. Como se usa en el presente documento, todas las formas están abarcadas, sin embargo, puede especificarse una forma en particular en un contexto particular.

Vacunas

Las vacunas de la invención también pueden comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable. Un excipiente farmacéuticamente aceptable es un material que puede usarse como un vehículo para el antígeno debido a que el material es inerte o de otro modo médicamente aceptable, así como compatible con el agente activo, en el contexto de la administración de vacunas. Además de un excipiente adecuado, un excipiente farmacéuticamente aceptable puede contener aditivos de vacuna convencionales como diluyentes, adyuvantes y otros inmunoestimulantes, antioxidantes, conservantes y agentes estabilizadores. Por ejemplo, puede añadirse polisorbato 80 para minimizar la agregación y actuar como un agente estabilizador, y puede añadirse un tampón para el control de pH.

Se conocen generalmente en la técnica métodos para realizar vacunas. Además, las vacunas de la presente invención pueden formularse para incluir un componente de "depósito" para aumentar la retención del material antigénico en el sitio de administración. Como ejemplo, además de un adyuvante (si se usa), puede añadirse alumbre (hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio), QS-21, dextrán sulfato o aceite mineral para proporcionar este efecto de depósito.

La presente invención también proporciona un método para tratar o prevenir una infección administrando cualquiera de las vacunas anteriormente descritas a un sujeto que lo necesite. Una población de sujetos diana para los métodos de tratamiento y prevención descritos en el presente documento incluye mamíferos, tales como seres humanos, bovinos, cerdos, que están infectados con, o en riesgo de infectarse por, patógenos bacterianos, tales como *S. aureus*. En algunas realizaciones, la infección para tratar o prevenir se asocia con un *S. aureus* resistente a metilicina. En realizaciones particulares, el *S. aureus* resistente a metilicina produce toxina alfa.

Una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de las vacunas de la invención puede determinarse por métodos que son rutinarios en la técnica. Los expertos en la técnica reconocerán que la cantidad puede variar con la composición de la vacuna, las características del sujeto particular, la vía seleccionada de administración, y la naturaleza de la infección bacteriana que se trata o previene. Puede encontrarse orientación general, por ejemplo, en las publicaciones de la Conferencia Internacional sobre la Armonización y en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Company 1990). Una dosificación de vacuna típica puede variar de 1 µg a 400 µg de antígeno.

La vacuna puede administrarse con o sin un adyuvante. Si se usa un adyuvante, se selecciona para evitar la toxicidad inducida por adyuvante. Por ejemplo, una vacuna de acuerdo con la presente invención puede comprender un β glucano como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.355.625, o un factor estimulante de colonias de granulocitos.

La vacuna puede administrarse en cualquier forma de dosificación deseada, incluyendo formas de dosificación que pueden administrarse a un mamífero por vía intravenosa, por vía intramuscular o por vía subcutánea. La vacuna puede administrarse en una única dosis, o de acuerdo con un protocolo de multidosis. La administración puede ser por cualquier número de vías, incluyendo subcutánea, intracutánea e intravenosa. En una realización, se usa administración intramuscular. El experto en la materia reconocerá que la vía de administración variará dependiendo de la infección bacteriana para tratar o prevenir y la composición de la vacuna.

La vacuna puede administrarse junto con un agente antiinfeccioso, un agente antibiótico y/o un agente antimicrobiano en una terapia de combinación. Los agentes antiinfecciosos ejemplares incluyen, pero sin limitación vancomicina y lisostafina. Los agentes antibióticos y agentes antimicrobianos ejemplares incluyen, pero sin limitación, penicilinas resistentes a penicilinas, cefalosporinas y carbapenemos, incluyendo vancomicina, lisostafina, penicilina G, ampicilina, oxacilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefradina, cefamandol, ceftioxitina, imipenem, meropenem, gentamicina, teicoplanina, lincomicina y clindamicina. Los agentes antiinfecciosos, antibióticos y/o antimicrobianos pueden combinarse antes de la administración, o administrarse simultáneamente o secuencialmente con la composición de vacuna.

Anticuerpos

Las construcciones de la presente invención pueden usarse para la preparación de anticuerpos. Esos anticuerpos se unen específicamente con un antígeno de hemolisina alfa de *S. aureus* o se unen específicamente con la secuencia o las secuencias heterólogas. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpo o cualquier combinación de los mismos. Los anticuerpos pueden formularse con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (es decir, de origen natural o formada por procesos recombinantes de fragmentos génicos de inmunoglobulina normales) (por ejemplo, un anticuerpo IgG) o una parte inmunológicamente activa (es decir, que se une específicamente) de una molécula de inmunoglobulina, incluyendo un fragmento de anticuerpo. "Anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan de forma sinónima en el presente documento. Un fragmento de anticuerpo es una parte de un anticuerpo tal como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, sFv, Nanocuerpos y similares. Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de

anticuerpos de cadena pesada de origen natural. La tecnología de nanocuerpos se desarrolló originalmente después del descubrimiento de que los camélidos (camellos y llamas) poseen anticuerpos completamente funcionales que carecen de cadenas ligeras. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (C_{H2} y C_{H3}). Resulta importante que el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que alberga la capacidad de unión a antígeno completo del anticuerpo de cadena pesada original. Los anticuerpos podrían obtenerse usando inmunización en seres humanos y animales (ratón, conejo, camello, llama, gallina, cabra).

Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que se reconoce por el anticuerpo de longitud completa y en el contexto de la presente invención. Se conocen bien en la técnica métodos para realizar y explorar fragmentos de anticuerpo.

Un anticuerpo o anticuerpos anti hemolisina alfa dirigidos a la secuencia homóloga que puede obtenerse de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por varios métodos diferentes. Por ejemplo, los anticuerpos pueden obtenerse de sujetos a los que se ha administrado el polipéptido recombinante de acuerdo con la presente invención. Los anticuerpos también pueden obtenerse de plasma explorado con respecto a anticuerpos de toxina alfa y/o anticuerpos de antígeno bacteriano, como se analiza en más detalle posteriormente. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden realizarse por métodos recombinantes. Se conocen bien en este campo técnicas para realizar anticuerpos monoclonales recombinantes. Pueden producirse anticuerpos policlonales recombinantes por métodos análogos a los descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2002/0009453, usando el polipéptido recombinante de acuerdo con la presente invención como el inmunógeno o los inmunógenos. Dicho anticuerpo obtenido de acuerdo con la invención puede ser un anticuerpo murino, humano o humanizado. Un anticuerpo humanizado es una proteína recombinante en la que las CDR de un anticuerpo de una especie; por ejemplo, un anticuerpo de roedor, conejo, perro, cabra, caballo, camello, llama o pollo (o cualquier otro anticuerpo animal adecuado), se transfieren de las cadenas variables pesada y ligera del anticuerpo de roedor a dominios variables pesados y ligeros humanos. Los dominios constantes de las moléculas de anticuerpo derivan de los de un anticuerpo humano. Se conocen bien en la técnica métodos para realizar anticuerpos humanizados. Más recientemente, se ha indicado que es posible generar hibridomas directamente de linfocitos B humanos. En consecuencia, el polipéptido recombinante de acuerdo con la presente invención podría usarse para estimular la proliferación de linfocitos B humanos antes de proceder a la generación de hibridomas.

Los anticuerpos anteriormente descritos pueden obtenerse por métodos convencionales. Por ejemplo, el polipéptido recombinante de acuerdo con la presente invención puede administrarse a un sujeto y las IgG resultantes pueden purificarse de plasma recogido del sujeto por metodología convencional.

Composiciones de anticuerpos

Las construcciones de la presente invención pueden usarse para la preparación de anticuerpos y composiciones de anticuerpos adecuados para la administración, tales como composiciones que comprende un anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones de anticuerpos pueden formularse para cualquier vía de administración, incluyendo intravenosa, intramuscular, subcutánea y percutánea, por métodos que se conocen en la técnica. En una realización, la composición de anticuerpo proporciona una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de anticuerpo, es decir, una cantidad suficiente para conseguir un efecto terapéutica o profilácticamente beneficioso. El anticuerpo puede ser una composición de anticuerpo protectora que neutraliza la infección y/o proporciona protección contra la infección.

La composición de anticuerpo puede ser una composición de IVIG. Como se usa en el presente documento, "IVIG" se refiere a una composición de inmunoglobulina adecuada para administración intravenosa. Las composiciones de IVIG pueden contener, además de inmunoglobulina, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones de IVIG pueden ser "IVIG específicas", lo que significa que IVIG contiene inmunoglobulinas que se unen específicamente con el antígeno o los antígenos representados por el polipéptido recombinante de acuerdo con la presente invención.

Una composición IVIG específica puede comprender tanto un anticuerpo que se une específicamente con un antígeno de hemolisina alfa de *S. aureus* (y que neutraliza opcionalmente el antígeno de hemolisina alfa) y un anticuerpo que se une específicamente con otro antígeno (y que neutraliza opcionalmente el otro antígeno), representado por la secuencia o las secuencias homólogas. Los anticuerpos y antígenos pueden ser cualquiera de los previamente descritos. Por ejemplo, el otro antígeno puede ser SEB (enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*), TSST (toxina de síndrome de choque tóxico), FnBP (proteína de unión a fibronectina); BlaZ (β lactamasa), ClfA (Factor de Aglutinamiento A), PBP2a (proteína de unión a penicilina 2a), proteína A todas derivadas de especies de *Staphylococcus*, preferentemente *Staphylococcus aureus*.

Métodos para realizar composiciones IVIG

Una composición IVIG se prepara administrando el polipéptido recombinante de acuerdo con la presente invención a un sujeto, después recogiendo plasma del sujeto y purificando inmunoglobulina del plasma.

El sujeto que se expone, o al que se administra, el antígeno o los antígenos, tal como el polipéptido recombinante de acuerdo con la presente invención, puede ser un ser humano o puede ser otro animal, tal como un ratón, un conejo, una rata, un pollo, un caballo, un perro, un primate no humano o cualquier otro animal adecuado. Los anticuerpos que se unen específicamente con el antígeno o los antígenos pueden obtenerse del plasma del animal por metodología de fraccionamiento de plasma convencional.

Los anticuerpos inducidos contra péptidos de la invención también pueden usarse para detectar la presencia de esos péptidos en diversos ensayos. Son ensayos preferidos inmunoensayos enzimáticos o radioinmunoensayos. Los anticuerpos también podrían usarse para desarrollar cromatografía de afinidad para purificar proteínas específicas o macromoléculas.

Tratamiento y prevención de infecciones con composiciones de anticuerpos

Las composiciones de anticuerpos anteriormente descritas, tales como las composiciones de IVIG anteriormente descritas, pueden administrarse a un sujeto que lo necesite para tratar o prevenir una infección. Una población de pacientes diana para el tratamiento y prevención de la infección incluye mamíferos, tales como seres humanos, que están infectados con o en riesgo de infectarse por patógenos bacterianos. La infección para tratar o prevenir puede ser una infección por *S. aureus* incluyendo una infección de *S. aureus* resistente a meticilina o *S. aureus* que produce toxina alfa o una infección por *S. epidermidis*.

El tratamiento o prevención de una infección por *S. aureus* puede conseguirse usando composiciones que comprenden un anticuerpo o anticuerpos dirigidos a los antígenos proporcionados con el polipéptido recombinante de acuerdo con la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización más, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales.

Una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de las composiciones de anticuerpo puede determinarse por métodos que son rutinarios en la técnica. Los expertos en la técnica reconocerán que la cantidad puede variar de acuerdo con los anticuerpos particulares dentro de la composición, la concentración de los anticuerpos en la composición, la frecuencia de administración, la gravedad de la infección para tratar o prevenir, y detalles del sujeto, tales como edad, peso y condición inmunitaria. La dosificación puede ser de al menos 50 mg de composición IVIG por kilogramo de peso corporal (mg/kg), incluyendo al menos 100 mg/kg, al menos 150 mg/kg, al menos 200 mg/kg, al menos 250 mg/kg, al menos 500 mg/kg, al menos 750 mg/kg y al menos 1000 mg/kg. Las dosificaciones para composiciones del anticuerpo monoclonal normalmente puede ser menores, tales como 1/10 de la dosificación de una composición IVIG, tal como al menos aproximadamente 5 mg/kg, al menos aproximadamente 10 mg/kg, al menos aproximadamente 15 mg/kg, al menos aproximadamente 20 mg/kg, o al menos aproximadamente 25 mg/kg. La vía de administración puede ser cualquiera de las apropiadas para una vacuna pasiva. Por lo tanto, se prevén vías de administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal y otras. Como se ha observado anteriormente, una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del anticuerpo es una cantidad suficiente para conseguir un efecto terapéutica o profilácticamente beneficioso. Una composición de anticuerpo protectora puede neutralizar y/o prevenir la infección. Una composición de anticuerpo protectora puede comprender cantidades de anticuerpo anti hemolisina alfa y/o anticuerpo contra la secuencia homóloga que no son protectores en sí mismos, sino que, en combinación, proporcionan una composición de anticuerpos protectora.

La composición de anticuerpos puede administrarse junto con un agente antiinfeccioso, un agente antibiótico y/o un agente antimicrobiano, en una terapia de combinación. Los agentes antiinfecciosos ejemplares incluyen, pero sin limitación vancomicina y lisostafina. Los agentes antibióticos ejemplares y agentes antimicrobianos incluyen, pero sin limitación penicilinas resistentes a penicilinas, cefalosporinas y carbapenemos, incluyendo vancomicina, lisostafina, penicilina G, ampicilina, oxacilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefradina, cefamandol, ceftioxitina, imipenem, meropenem, gentamicina, teicoplanina, lincomicina y clindamicina. Los agentes antiinfecciosos, antibióticos y/o antimicrobianos pueden combinarse antes de la administración, o administrarse simultánea o secuencialmente con la composición de IVIG.

Pueden administrarse relativamente pocas dosis de composición de anticuerpos, tal como una o dos dosis, y se emplea terapia de antibióticos convencional, que generalmente implica múltiples dosis durante un periodo de días o semanas. Por lo tanto los antibióticos pueden tomarse una, dos o tres o más veces diariamente durante un periodo de tiempo, tal como durante al menos 5 días, 10 días o incluso 14 o más días, mientras que la composición de anticuerpo se administra habitualmente solamente una o dos veces. Sin embargo, las diferentes dosificaciones, el momento de las dosificaciones y cantidades relativas de la composición de anticuerpo y antibióticos pueden seleccionarse y ajustarse por un experto habitual en la materia.

Figuras

La **Figura 1** muestra la estructura tridimensional de la forma heptamérica de hemolisina alfa (panel A). El panel B muestra la estructura monomérica en el multímero. El panel C muestra una vista ampliada de la región triangular. La región triangular, formada por los restos Asp103 a Thr109 y Val149 a Asp152, conecta el dominio del tallo (restos Lys110 a Tyr148) con el núcleo de tipo sándwich β .

La **Figura 2** muestra la construcción de ICHA, ICHA I e ICHA II. Los números 1 a 8 corresponden a las diferentes regiones proteicas en las que se han creado sitios de inserción.

La **Figura 3** muestra la producción y purificación de HA e ICHA I en condiciones desnaturalizantes. El panel A muestra un SDS-PAGE teñido con Coomassie de muestras preparadas durante la purificación de HA. Carril M, marcadores de peso molecular con el tamaño de las proteínas indicadas; carril TE, sobrenadante formado de la fracción insoluble que contiene HA sobreexpresada; carril IB, cuerpos de inclusión; carril P, proteína HA purificada por cromatografía de IMAC. El panel B muestra un SDS-PAGE teñido con Coomassie de muestras preparadas durante la purificación de ICHA. Carril M: marcador de masa molecular con el tamaño de las proteínas indicado; carril S: fracción soluble aislada de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET28b-ICHA después de 4 horas de inducción de expresión de proteínas recombinantes con IPTG 1 mM a 37 °C; carril IB: cuerpos de inclusión; carril P: proteína ICHA I purificada por cromatografía de IMAC.

La **Figura 4** muestra ensayos de hemólisis que muestran la ausencia de la actividad hemolítica de ICHA I, ICHA II.

La **Figura 5** muestra la unión y formación de oligómeros de HA, ICHA I e ICHA I 008 en presencia de eritrocitos de conejo.

La **Figura 6** muestra la unión de HA e ICHA I con eritrocitos de conejo.

La **Figura 7** muestra los espectros de dicroísmo circular de UV lejano realizados sobre un intervalo de longitudes de onda de 190 - 250 nm.

La **Figura 8** muestra fluorescencia intrínseca de HA, ICHA I e ICHA II, usando una longitud de onda de excitación de 280 nm y los espectros de emisión se registraron de 300 a 400 nm.

La **Figura 9** muestra los resultados con respecto a la producción de anticuerpos frente a ClfA (501-559) en respuesta a inmunizaciones con ClfA (501-559) e ICHA I 008. Las inmunizaciones se realizaron en ratones BALB/c. El panel A corresponde a curvas de serotitulación de IgG total anti ClfA. El panel B corresponde a la cinética de inducción de IgG total anti ClfA. El panel C describe el porcentaje de ratones BALB/c inmunizados que desarrollan una respuesta de IgG anti ClfA positiva.

La **Figura 10** muestra los resultados con respecto a la producción de anticuerpos contra proteína A (224-248) en respuesta a inmunizaciones con ICHA I 014. Las inmunizaciones se realizaron en ratones BALB/c. El panel A corresponde a curvas de serotitulación de IgG total anti HA. El panel B corresponde a la cinética de inducción de IgG total anti proteína A (224-248). El panel C describe el porcentaje de ratones BALB/c inmunizados que desarrollan una respuesta de IgG anti HA y anti proteína A (224-248) positiva el día 70.

La **Figura 11** muestra los resultados con respecto a la producción de anticuerpos contra proteína A total en respuesta a inmunización con ICHA I 014. Las inmunizaciones se realizaron en ratones BALB/c. El panel A describe la técnica usada para realizar la serotitulación. El panel B corresponde a la serotitulación de IgG total anti proteína A los días 0 y 70.

La **Figura 12** muestra la serotitulación de suero policlonal de conejo obtenida después de inmunización con ICHA I 003. Pre e Inm corresponden al suero preinmunitario y el suero obtenido después de 3 inyecciones (día 72), respectivamente. La serotitulaciones se realizaron contra HA y dos proteínas de fusión MBP distintas que contenían el epítipo SEB o el epítipo TSST-1.

La **Figura 13** muestra los resultados con respecto a la inmunización de conejo con ICHA I 003 que induce anticuerpos neutralizadores contra HA. Pre e Inm corresponden al suero preinmunitario y al suero obtenido después de 3 inyecciones, respectivamente. Se han realizado ensayos de hemólisis de acuerdo con el procedimiento descrito en la Figura 4.

La **Figura 14** muestra la organización estructural de la proteína estafilocócica A. "S" representa la secuencia señal; "W" representa la región que atraviesa la pared; "Wr" está compuesta de una repetición octapeptídica, y "Wc" es una región no repetida. "A, B, C, D, E" representan regiones extracelulares.

La **Figura 15** muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los cinco dominios de proteína Estafilocócica A de origen natural. Las tres hélices α están delimitadas por flechas.

5 La **Figura 16** muestra la reactividad de ELISA de los polítopos de ICHA derivados de SpA (proteína Estafilocócica A) para anticuerpo monoclonal de ratón anti ClfA. El dominio de unión a inmunoglobulina completo (ICHA I 009) y las tres hélices α del dominio SpA se usaron para recubrir placas de ELISA de microtitulación. La proteína ICHA I 000 se tomó como control. Los cinco polipéptidos se ensayaron con respecto al reconocimiento del anticuerpo IgG de ratón en experimentos de ELISA. Los anticuerpos unidos se detectaron con IgG de cabra anti ratón marcado con peroxidasa de rábano rústico (HRP). La reacción se desarrolló usando sustrato TMB
10 durante 10 minutos, la reacción enzimática se detuvo mediante adición de H₂SO₄ 1 M y la absorbancia se leyó a 450 nm.

La presente invención se describirá adicionalmente por los siguientes ejemplos.

15 Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de hemolisina alfa vehículo inactivada (ICHA I e ICHA II).

20 La hemolisina alfa (HA) vehículo inactivada (ICHA I e ICHA II) de acuerdo con la presente invención se construyó de la siguiente manera: se realizó la inactivación de toxicidad de hemolisina alfa (HA) por la sustitución de 42 aminoácidos del dominio central que abarcan los restos Thr109 a Gln150 con el tripéptido Pro-Gly-Asn (Figura 2, tabla 1). Este péptido permite la creación de un sitio de restricción SmaI en la secuencia de nucleótidos correspondiente, que permite la clonación interna posterior de grandes secuencias nucleotídicas heterólogas en el gen codificante de ICHA. El fragmento sustituido corresponde al dominio del tallo de HA (Figuras 1 y 2). Este
25 dominio está flanqueado en sus extremos N y C terminales por la región triangular. El dominio del tallo se caracteriza por las dos cadenas β antiparalelas del dominio rico en glicina central y participa en la formación de la pared del canal por autoensamblaje en un barril β de 14 cadenas.

30 El reto de esta etapa consiste tanto en desarrollar una toxina que pierda su actividad hemolítica como en crear un sitio de inserción permisivo de polipéptidos heterólogos grandes sin interferir con las otras propiedades biológicas del vehículo. Esta son características relacionadas con la estructura de la proteína nativa, la capacidad para unirse con bicapas lipídicas y formar oligómeros, y la capacidad para inducir anticuerpos neutralizadores de la actividad hemolítica de HA. Para mantener estas condiciones, el dominio del tallo se sustituyó mientras que esencialmente se mantenía la integridad de la región triangular. Esta región se usa como un enlazador natural para evitar el impedimento estérico entre el inserto y el vehículo.
35

La inserción de sitios de asociación adicionales en el gen que codifica ICHA da lugar a ICHA I e ICHA II. Estos sitios de restricción ofrecen la posibilidad de presentar polipéptidos pequeños en la superficie de la proteína vehículo. Con respecto a la estructura tridimensional de HA, no se ha creado ningún sitio de inserción en el dominio del borde de
40 HA para evitar la modificación estructural y por lo tanto su inmunogenicidad. Estudios cristalográficos de alta resolución de complejos de fosfolípidos-HA definen la región de interacción en un hueco entre el borde y los dominios del tallo. En consecuencia, la seroneutralización de HA podría obtenerse mediante prevención de la interacción del monómero de HA con la membrana celular por medio de la unión de anticuerpos con el dominio del borde. Todas las modificaciones introducidas en HA se enumeran en la Tabla 1.
45

Los genes modificados por ingeniería genética que codifican ICHA I e ICHA II se clonaron en pET28b para proporcionar pET28b ICHA I y pET28b ICHA II. Para cada una de estas construcciones, fue posible expresar la proteína en fusión con un marcador de polihistidina en su extremo C terminal. Las secuencias de aminoácidos de hemolisina alfa y sus formas mutadas relacionadas ICHA I e ICHA II se describen en los listados de secuencias.
50 SEC ID N°: 1 se refiere a la hemolisina alfa de tipo silvestre de *Staphylococcus aureus*, mientras que SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 5 se refieren a las construcciones ICHA I e ICHA II que se modifican de acuerdo con los detalles proporcionados en la tabla 1.

55 Construcción de plásmidos

Hemolisina alfa:

60 El gen de HL alfa se obtuvo por amplificación por PCR del ADN genómico de la cepa de *S. aureus* usando el cebador NcoIHL y el cebador H3HLHis (tabla 4). El cebador NcoIHL crea un nuevo codón de inicio y un sitio NcoI inmediatamente antes del codón de Ala del polipéptido maduro. El H3HLHis crea un nuevo sitio HindIII en el extremo 3'.

65 Se suprimió la secuencia líder hidrófoba de 26 aminoácidos. El fragmento amplificado por PCR se insertó directamente en el vector pGEM. El gen codificante de HL alfa se secuenció completamente y se volvió a clonar entre los sitios NcoI y HindIII del vector de expresión pET28b(+).

ICHA:

Se retiró el ADN que codificaba los restos centrales Thr109 - Gln150 del gen de HA por el método de PCR de extensión solapante. En PCR separadas, se amplificaron dos fragmentos del gen diana. La primera reacción usó el cebador NcoIHL flanqueante que hibridaba cadena arriba del gen que codifica la hemolisina alfa y el cebador HL108-antisentido interno que hibridaba con el sitio de delección. La segunda reacción usó el cebador H3HLHis antisentido flanqueante que hibridaba cadena arriba del gen codificante de hemolisina alfa y el cebador HL108+ con sentido interno que hibridaba con el sentido de delección. Los dos fragmentos se purificaron por electroforesis en gel de agarosa y se fusionaron desnaturalizándolos e hibridándolos en una reacción de extensión de cebadores posterior. Por adición de cebadores flanqueantes extras, el fragmento de 778 pb se amplificó adicionalmente por PCR, se purificó y se clonó en vector pGEM. El gen de ICHA se secuenció en su totalidad. No se observaron diferencias de secuencia del gen de HL excepto por los restos suprimidos (Thr109 - Gln150), que se reemplazaron por Pro-Gly-Asn en el gen de ICHA. El gen codificante de ICHA se volvió a clonar entre los sitios NcoI y HindIII del vector de expresión pET28b(+).

ICHA II:

Se usó el método de PCR de extensión solapante para introducir nuevos sitios de endonucleasas de restricción en el gen codificante de ICHA. En PCR separadas, se amplificaron dos fragmentos del gen diana. La primera reacción usó el cebador NcoIHL flanqueante y el cebador inverso de sitio endonucleasa de restricción interno que hibridaba con el sitio de inserción. La segunda reacción usó el cebador H3HLHis flanqueante y el cebador con sentido-inverso del sitio de endonucleasa de restricción interno que hibridaba con el sentido de inserción. Los dos fragmentos se purificaron por electroforesis en gel de agarosa y se fusionaron desnaturalizándolos e hibridándolos en una reacción de extensión de cebadores posterior. Mediante la adición de cebadores flanqueantes extra, el ICHA I más el nuevo fragmento de sitio de restricción se amplificó adicionalmente por PCR, se purificó y se clonó en el vector pGEM. El ICHA I más el nuevo gen codificante de sitio de restricción se secuenció completamente y se usó como matriz para introducir un segundo nuevo sitio de endonucleasa de restricción en el gen codificante de ICHA. Esta estrategia se ha usado para crear los sitios de endonucleasa de restricción para BamHI, PstI, SacI, EcoRI y NheI.

Tabla 1. Modificaciones introducidas en hemolisina alfa. La tabla muestra la región de secuencia de aminoácidos en la que se han añadido aminoácidos. Los restos de aminoácidos insertados se muestran en negrita. En el sitio N° 1 los aminoácidos subrayados son el tripéptido Pro-Gly-Asn que sustituye los 42 aminoácidos en la posición 109 a 150 del dominio central de la secuencia de tipo silvestre.

sitio de restricción (sitio de inserción N°:)	región de secuencia de aminoácidos de hemolisina alfa *	secuencia de aminoácidos de ICHA I	secuencia de aminoácidos de ICHA II
NcoI (sitio N°: 2)	1 ADSDI 5	MADSDI	MADSDI
BamHI (sitio N°: 7)	30 KENGMH 35		KENGSGMH
PstI (sitio N°: 4)	43 IDDKNH 48		IDDLQKNH
SacI (sitio N°: 6)	92 DNEVAQ 97		DNEELVAQ
SmaI (sitio N°: 1)	106 SID 108 - 151 PDF 153	SID<u>PGN</u>PDF	SID<u>PGN</u>PDF
EcoRI (sitio N°: 8)	155 TILESP 160		TILEFESP
NheI (sitio N°: 5)	235 DRKASK 240		DRKASASK
HindIII (sitio N°: 3)	288 KEEMTN 293	KEEMTNKL	KEEMTNKL

* los números indican las posiciones de aminoácidos con respecto a SEC ID N°: 1

Ejemplo 2: modificación por ingeniería genética de polipéptidos relacionados con ICHA I.

Todos los epítomos heterólogos presentados en ICHA I se enumeran en la tabla 2. Los poliepítomos resultantes se enumeran y se describen en la tabla 3.

Tabla 2: epítomos y secuencias de aminoácidos usados como secuencia homóloga para integración en el polipéptido de hemolisina recombinante alfa.

factor de virulencia	nombre de entrada y número de referencia	fragmento de aminoácidos	localización en el factor de virulencia (posiciones de aminoácidos)	sitio de inserción en ICHA I N°:
SEB	P01552	SEC ID N°: 7	179-188	2
SEB	ETXB_STAAU	SEC ID N°: 8	176-191	3
TSST-1	P06886 TSST_STAUU	SEC ID N°: 9	87-101	3
PBP2a	P07944 PBP_STAUU	SEC ID N°: 10	376-451	1
BlaZ	P00807 BLAC_STAUU	SEC ID N°: 11	134-190	1
FnBP	Q8NUU7 FNBA_STAAW	SEC ID N°: 12	764-780 802-818	1 + 3
FnBP		SEC ID N°: 13	842-855	1 + 3
CifA	Q6GIK4 CLFA_STAAR	SEC ID N°: 14	501-559	1
Proteína A	A1KDX6_STAUU	SEC ID N°: 15	187-248	1
Proteína A		SEC ID N°: 16	187-205	1
Proteína A		SEC ID N°: 17	206-223	1
Proteína A		SEC ID N°: 18	224-248	1

Tabla 3: la serie de poliepítomos de ICHA construidos en la presente invención.

construcción	sitio de inserción N°: 1	sitio de inserción N°: 2	sitio de inserción N°: 3
ICHA I 000			
ICHA I 001		SEB (179-188)	
ICHA I 002			TSST (87-101)
ICHA I 003		SEB (179-188)	TSST (87-101)
ICHA I 004			SEB (176-191)
ICHA I 005	PBP2a (376-451)		
ICHA I 006	BlaZ (134-190)		
ICHA I 007	FnBP (764-780 / 842-855)		
ICHA I 008	CifA (501-559)		
ICHA I 009	Proteína A (187-248)		
ICHA I 010	CifA (501-559)		FnBP (764-780 / 842-855)
ICHA I 011	CifA (501-559)		SEB (176-191) / TSST (87-101)
ICHA I 012	Proteína A (187-205) hélice 1		
ICHA I 013	Proteína A (206-223) hélice 2		
ICHA I 014	Proteína A (224-248) hélice 3		

5

El polipéptido de ICHA I recombinante en el que la secuencia heteróloga se inserta en el sitio 1.

La secuencia heteróloga se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de *S. aureus* usando cebadores oligonucleotídicos específicos (tabla 4). La amplificación de ADN se realizó usando ADN polimerasa pfx; el producto de PCR se clonó en un sitio SmaI en el vector pET28b-ICHA para producir el péptido recombinante.

10

El polipéptido de ICHA I recombinante en el que la secuencia heteróloga está fusionada con el sitio 2 o 3.

5 La secuencia heteróloga grande se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de *S. aureus* usando cebadores oligonucleotídicos específicos. Los cebadores usados crean los sitios flanqueantes NcoI o HindIII. La amplificación de ADN se realizó usando ADN polimerasa pfx; el producto de PCR se clonó en un sitio NcoI o HindIII en el vector pET28b-ICHA para producir el péptido recombinante.

10 La secuencia heteróloga pequeña se amplificó por hibridación de dos cebadores oligonucleotídicos complementarios. Los cebadores oligonucleótidos usados crean un nuevo sitio de restricción NcoI o HindIII que flanquea las secuencias heterólogas. El producto de hibridación se clonó en un sitio NcoI o HindIII en el vector pET28b-ICHA para producir el péptido recombinante.

Tabla 4: cebadores oligonucleotídicos sintéticos para construir las construcciones

Cebador	Técnica usada	Secuencia (5' - 3') ^a
NcoIHL	PCR	GGCCATGGCAGATTCTGATATAATATAAACCCTACTACAGAT
H3LHLIS	PCR	GCAAGCTATTGTGTCATTTCTCTTTTCCCAATCGATTTTATA
HL108+	PCR	GATCCCGGAACCTGATTTCAAAACAATTTAGAGAGCCCA
HL108-	PCR	AATTGTTTTGAAATCAGGGTCCCGGATCAATCGAATTTCTTGGATAGTAATCAGATAT TTG
BamHI_sentido	PCR	TATGATAAAGAAAAATGGATCCGGCATGCACAAAAA
BamHI_inverso	PCR	TTTTTTGTGCATGCCGGATCCATTTTCTTTATCATA
PstI_sentido	PCR	AGIIATCGATGATCTGCAGAAAAAATCATAATAA
PstI_inverso	PCR	TTTATTATGATTTTCTGCAGATCATCGATAAAACT
EcoRI_sentido	PCR	TTCAAAACAATTTAGAAATTCGAGAGCCCAACTGAT
EcoRI_inverso	PCR	ATCAGTTGGGCTCTCGAATTCATAAAATGTTTTGAA
NheI_sentido	PCR	ACTATGGATAGAAAAAGCTAGCGCATCCAAACAACAA
NheI_inverso	PCR	TTGTTGTTGGATGCGCTAGCTTTTCTATCCATAGT
SacI_sentido	PCR	TTGCACTGGACTTCAGAGCTCACAAATTTGGAAAAGGT
SacI_inverso	PCR	ACCTTTCCAAATTTGTAGGCCTGAAGTCCAGTGCAG
SEB sentido	Hibridación	CCATGGGCAAAAAGAAAGTGACAGCGCAGGAGCTTGACGCCATGG
SEB inverso	Hibridación	CCATGGCGTCAAGCTCCTGCGGTGTACATTTCTTTTGGCCCATGG
SEB sentido grande	Hibridación	AAGCTTCAAACCTAATAAGAAAAAGGTGACTGCTCAAGAAATTAGATTACCCTAACTAAGCTT
SEB inverso grande	Hibridación	AAGCTTAGTTAGGTAATCTAATTTCTTGGCAGTCACCTTTTCTTATTAGTTTGAAGCTT
TSS1-1 sentido	Hibridación	AAGCTTTCCGAGTCTTATTATAGCCCTGCTTTTACAAAAAGGGAAAAAGCTT
TSS1-1 inverso	Hibridación	AAGCTTTCCCCCTTTGTAAAAAGCAGGGCTATAATAAGGACTCGGAAAAAGCTT
SEB-TSST sentido	Hibridación	AAGCTTCAAACCTAATAAGAAAAAGGTGACTGCTCAAGAAATTAGATTACCCTAAGTGGGAG CGGGTTCCGAGTCTTATTATAGCCTGCTTTTACAAAAAGGGAAAAAGCTT
SEB-TSST inverso	Hibridación	AAGCTTTCCCCCTTTGTAAAAAGCAGGGCTATAATAAGGACTCGGAAAAAGCTTCCAG TTAGGTAATCTAATCTTGGCAGTCACCTTTTCTTATTAGTTTGAAGCTT
CfIA sentido	PCR	TTTCTTGGTGATTTAGCACTACGTTCCGACATTTTAT
CfIA inverso	PCR	TGGTAGCTCTGGAATGGGTTCAATTTCCACCGGCTC

FnBP sentido	Hibridación	TGGTCGAAATATGAACAAGGTGGCAATATTGTAGATATCGATTCGACAGTGTACCTCA ATTCGGTGGACACAATAGTGTGACITTTGAAGATACACGGTCAA
FnBP inverso	Hibridación	TTGACGTGTATCTTCAAAGTCAACACTATTGTGCCACCGAATTGAGGTACACTGTCTCGA AATCGATATCTACAATATTGCCACCTTGTTCATATTTTCGACCA
FnBP-HindIII sentido	PCR	<u>AAGCTTAAATATGAACAAGGTGGCAATATTGTAGAT</u>
FnBP-HindIII inverso	PCR	<u>AAGCIIITGATCTTCAAAGTCAACACTATTGTGTCC</u>
MecA sentido	PCR	TGTGGGGCATGAGTAACGAAGAATAATAAATTA
MecA inverso	PCR	CCCACATACCACCTTCATAGCGTGTAAACGTTGTAACC
BlaZ sentido	PCR	GGTGAATCAAAAAAAGTTAAACAACCGTCTAAAAGAA
BlaZ inverso	PCR	TAATTTCCATTGGCGATAAGTTTATTAAAGGGTCTTACC
Proteína A sentido	PCR	AACAATTTCAACAAAAGAACAACAAAATGCTTTCTAT
Proteína A inverso	PCR	TTTTTTGTTGCTTCCCTCTTTTGGTGTGAGCATC
Proteína A-H1 sentido	PCR	AACAATTTCAACAAAAGAACAACAAAATGCTTTCTAT
Proteína A-H1 inverso	PCR	GTTAGGTAATGTAAAGTTTCATAGAAAGC
Proteína A-H2 sentido	PCR	TAAGTGAAGAACAACGTAACGGCTTCATCC
Proteína A-H2 inverso	PCR	TGATGGATCGTCTTTAGGGCTTTGGATGAA
Proteína A-H3 sentido	PCR	GTGAGCAAAAGAAATTTAGCAGAAAGCTAAA
Proteína A-H3 inverso	PCR	TTTTTTGTTGCTTCCCTCTTTTGGTGTGAGCATC

^a Los sitios de restricción están subrayados

Ejemplo 3: Producción, purificación y renaturalización de poliepitopos de HA, ICHA I, ICHA II e ICHA.

El procedimiento empleado para suministrar proteína purificada y replegada depende de la presencia de un marcador de polihistidina en el extremo C terminal de la proteína.

Producción

La proteína HA recombinante y sus derivados se sobreprodujeron en *E. coli* BL21 (DE3) que albergaba el plásmido pET28b deseado. Se inició el cultivo de diez mililitros de LB que contenía kanamicina 50 µg/ml de una única colonia de placa recién transformada y se cultivó durante una noche a 37 °C. Se inoculó un litro de medio TB que contenía kanamicina 50 µg/ml y se permitió que creciera a 37 °C. Cuando la DO600 nm alcanzó un valor de 1,2, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y se permitió que el cultivo creciera durante 4 horas adicionales a 37 °C. A esta temperatura, la proteína se produce principalmente en forma de cuerpos de inclusión. Puede obtenerse expresión proteica soluble cuando se induce a 18 °C.

Purificación y renaturalización de proteínas marcadas con His

Las bacterias se sedimentaron a 3000 xg durante 15 minutos a 4 °C. Se descubrió que la mayoría de la proteína existía en forma de cuerpos de inclusión. Las células se resuspendieron en tampón A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM) y se lisaron por sonicación suave. La fracción de proteína insoluble se recuperó por centrifugación a 12.000 xg durante 30 minutos a 4 °C y se resuspendió en tampón B (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, que contenía Tritón X-100 0,5 % (v/v)) y se dejó agitar durante 16 horas a 4 °C. Los cuerpos de inclusión se recuperaron sucesivamente por centrifugación a 30.000 xg durante 30 minutos a 4 °C, se resuspendieron en tampón C (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, urea 8 M) y se incubaron a 4 °C durante 16 horas, con agitación. Los cuerpos de inclusión se centrifugaron después a 30.000 xg durante 30 minutos, y el sobrenadante se cargó en una columna de afinidad de quelante metálico (Agarosa NiNTA) equilibrada en tampón C. Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de imidazol 500 mM en tampón C. Las fracciones se recogieron y se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones máximas se agruparon y se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) diez veces que contenía N-Lauroil-sarcosina 0,5 %. La proteína se renaturalizó por diálisis frente a tampón de PBS y se concentró por ultrafiltración con una membrana de Amicon PM-10. La figura 3 ilustra la purificación de la HA recombinante y la recuperación de su actividad hemolítica después de la etapa de renaturalización, respectivamente.

Purificación y renaturalización de proteínas no marcadas con His

Los cuerpos de inclusión se prepararon como se ha descrito anteriormente para proteínas marcadas con His y se resuspendieron en tampón D (Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, urea 8 M) y se incubaron a 4 °C durante 16 horas, con agitación. Los cuerpos de inclusión se centrifugaron después a 30.000 xg durante 30 minutos, y el sobrenadante se sometió a cromatografía de intercambio aniónico en columna Source 15Q (GE Healthcare) previamente equilibrada con cinco volúmenes de columna de tampón D. Después de lavar la columna con cinco volúmenes de columna de tampón de equilibrio, las proteínas unidas se eluyeron a un caudal de 3 ml/minuto con un gradiente lineal de NaCl 500 mM en tampón D sobre 10 volúmenes de columna. Las fracciones se recogieron y se evaluó la pureza por SDS-PAGE como mayor del 98 %. Las fracciones máximas se agruparon y se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) diez veces que contenía N-Lauroil-sarcosina 0,5 %. La proteína se renaturalizó como se ha descrito anteriormente para proteínas marcadas con His.

Ejemplo 4: ausencia de actividad hemolítica con ICHA I e ICHA II.

Las proteínas purificadas HA, ICHA I e ICHA II se ensayaron a una concentración final de 0,3 mg/ml con respecto a actividad hemolítica frente a eritrocitos de conejo desfibrinados lavados (rRBC) diluidos 1/20 en PBS. Estos eritrocitos son hipersensibles a HA. En comparación, se requiere una concentración 400 veces mayor de la toxina para lisar los eritrocitos humanos. Después de 30 minutos de incubación a 30 °C, los rRBC se sedimentan por centrifugación y la hemólisis se controla midiendo la hemoglobina en el sobrenadante a 540 nm. La Figura 4 atestigua la ausencia de actividad hemolítica cuando se usan grandes cantidades de ICHA I e ICHA II. Además, un análisis comparativo con una HA comercial purificada de sobrenadante de *S. aureus*, indica que el replegamiento de HA de acuerdo con el proceso de los inventores es eficaz.

Ejemplo 5: los poliepitopos de ICHA I, ICHA II e ICHA se unen con bicapa lipídica, forman oligómero y conservan las características espectroscópicas de HA.**Análisis por transferencia de Western**

Se incubaron 40 µg de proteínas (HA, ICHA I e ICHA I 008) a 37 °C durante 15 minutos con 300 µl de una dilución de glóbulos rojos 1:20. Después se aisló la fracción de membrana por centrifugación de 30 minutos a 13.000 g. El sedimento se resuspendió en 300 µl de agua fría y se añadió solución desnaturalizante (Tris-HCl 0,06 M, pH 6,8, SDS 1 %, glicerol 9,5 %, mercaptoetanol 3,3 %, azul de bromofenol 0,002 %). Las muestras se cargaron en un PAGE-SDS 10 %. Se examinó la unión y formación de oligómeros por transferencia de Western usando un

anticuerpo monoclonal anti HA y un anti IgG de ratón monoclonal conjugado con HRP (Amersham Pharmacia). Cada muestra cargada correspondía a 1,8 μg de proteína. Los resultados se presentan en la Figura 5. Como conclusión, se demuestra que ICHA I y sus poliepitopos relacionados aún son capaces de unirse con bicapa lipídica y formar oligómeros de una manera similar a HA.

5

Análisis por fluorescencia directa

Se marcaron proteínas HA e ICHA I con el fluoróforo AMCA-X (kit de Marcaje de Proteína AMCA-X AnaTag™, ANASpec), excitación a 347 nm y emisión a 447 nm. Después se incubaron eritrocitos durante 10 minutos a 25 °C con 40 μg de HA-AMCA-X o ICHA I-AMCA-X. Las células se lavaron dos veces con PBS y después se fotografiaron con una AxioCam MRm enfriada (Zeiss) montada en un microscopio Zeiss Axio Imager.Z1 mediante un objetivo de inmersión en aceite EC Plan-NEOFLUAR 100 x 1,3 en fluorescencia (con un ajuste de filtro 20 (Zeiss)). Se capturaron imágenes usando el AxioVision Rel 4.5 (Zeiss). Los resultados se presentan en la Figura 6. Estos datos confirman que ICHA I aún es capaz de unirse con la bicapa lipídica y formar balsas proteicas en la superficie de membranas celulares.

10

15

Análisis por fluorescencia y CD-UV lejano

Dicroísmo circular (CD)

20

25

Para evaluar los cambios de estructura secundaria inducidos por inserción de sitio en la proteína HA, se midieron los espectros de dicroísmo circular de UV lejano de 190 - 250 nm usando un espectropolarímetro JASCO J-810. La velocidad de exploración fue de 50 nm / minuto. Se realizaron diez exploraciones por muestra y las concentraciones de proteína fueron 4,2 μM en tampón de PBS para las dos proteínas. La elipticidad media de los restos, $[\theta]$, se proporciona en $\text{grad. cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$: $[\theta] = [\theta]_{\text{obs}} (\text{PMR}/10 \text{ l c})$, donde $[\theta]_{\text{obs}}$ es la elipticidad medida en miligrados, PMR es el peso molecular medio de los restos de la proteína, c es la concentración de la muestra en mg/ml y l es la longitud de la ruta óptica de la célula en cm.

30

Los espectros de CD indican que la proteína ICHA I posee un alto contenido de lámina β y son similares a los espectros de CD de hemolisina alfa (Figura 7).

Espectroscopia de fluorescencia

35

Se examinaron cambios estructurales inducidos por los sitios de inserción en la proteína HA por fluorescencia intrínseca usando una longitud de onda de excitación de 280 nm y los espectros de emisión para HA, ICHA I e ICHA II 1.5 μM se registraron de 300 a 400 nm. Todos los espectros se registraron a concentraciones proteicas de 4,2 μM en tampón de PBS. Se realizaron mediciones de fluorescencia en el espectrofluorómetro AMINCO SLM 8100.

40

Tanto la espectroscopia de fluorescencia como los espectros de CD de UV lejano para los derivados de HA son altamente similares a los de la proteína HA, lo que indica que las ICHA I e ICHA II obtenidas conservan su conformación nativa (Figura 8).

Ejemplo 6: anticuerpos inmunopotenciados de poliepitopos de ICHA contra los insertos y HA en un modelo murino.

45

Inmunización y respuesta de anticuerpos frente a ICHA I 008 y fragmento de ClfA.

50

Se amplificó un fragmento ClfA de 177 pb, correspondiente al aminoácido Gly501 a Glu559 del ClfA de tipo silvestre, por PCR a partir del plásmido pET28b-ICHA-ClfA usando cebadores que incorporaron secuencias para el sitio NcoI en el extremo 3' y sitio HindIII en los extremos 5' de endonucleasas de restricción. Los fragmentos amplificados se digirieron doblemente con NcoI y HindIII y se ligaron en los mismos sitios del vector pET28b para producir el péptido recombinante. Se purificó el fragmento de ClfA marcado con His por cromatografía de afinidad usando columna de afinidad de quelante metálico (agarosa NiNTA).

55

60

Se obtuvieron ratones hembra BALB/c, de 8 a 10 semanas de edad, de Harlan (Horst, Países Bajos). Se inmunizaron tres grupos de diez ratones por vía subcutánea con 1,33 nmoles de ICHA I 008 (50 μg) o fragmento ClfA (10,8 μg) o ICHA I (40 μg) emulsionado en adyuvante Quil A. Se realizaron inmunizaciones dos veces proporcionando un intervalo de tres semanas entre las inmunizaciones. Se inmunizó a un grupo más de ratones con el mismo volumen de adyuvante Quil A en PBS y se tomó como control. Se recogieron sueros los días 0, 35 y 52 (indicados en la leyenda de la figura como j0, j35 y j52 respectivamente) por sangrado de la cola y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Se exploraron las respuestas de anticuerpos específicas por ELISA con respecto a reactividad con proteína de fusión MBP-ClfA como antígeno de recubrimiento.

65

Se ensayaron sueros recogidos en cada punto temporal de ratones individuales (grupos de ensayo y de control) con respecto a reconocimiento de fragmento de ClfA por ELISA. Se recubrieron placas de microtitulación de ELISA

(Placa Nunc-Immuno, Roskilde, Dinamarca) con MBP-ClfA (250 ng/pocillo) en tampón de recubrimiento (tampón de carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6) y se incubaron durante una hora a 20 °C. Las placas se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 (PBST) 0,05 % y se bloquearon con 150 µl de hidrolizado de caseína 3 % en PBS durante 1 hora a 20 °C. Se incubaron sueros de ensayo diluidos en serie dos veces en PBST comenzando con 1:50 en pocillos (50 µl/pocillo) durante 1 hora a 20 °C. Los pocillos se lavaron tres veces con PBST. Los anticuerpos unidos se detectaron por incubación de 30 minutos a 20 °C con anti IgG de ratón de cabra marcado con peroxidasa de rábano rústico (HRP). La reacción se desarrolló usando tetrametilbencidina (TMB) durante 10 minutos, la reacción enzimática se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 1 M y la absorbancia se leyó a 450 nm.

El análisis de los niveles de IgG totales (Figura 9a) muestra que las inmunizaciones con el fragmento de ClfA presentado en ICHA I 008 inducen las respuestas anti ClfA en suero más fuertes en comparación con inmunizaciones con ClfA solamente, lo que sugiere que la proteína vehículo induce la respuesta inmunitaria contra este polipéptido.

Se compararon sueros de ratones inmunizados con respecto a anticuerpos anti ClfA por ELISA a una dilución en suero 1:800 en función del tiempo (en días) (véase Figura 9b). En el caso de ICHA I 008, se inducen altos títulos de anti ClfA y se alcanza un máximo el día 35 lo que indica que la segunda inmunización no se requiere para obtener este máximo. Para inmunizaciones con el fragmento de ClfA solamente, el control de anticuerpos anti ClfA indica que se requiere una segunda inmunización para aumentar la respuesta inmunitaria contra ClfA y que no se detectó meseta el día 52. Estos resultados sugieren que la proteína vehículo induce la respuesta inmunitaria contra este polipéptido.

La Figura 9c indica que todos los animales indujeron anticuerpos contra ClfA cuando recibieron ICHA I 008. La baja variabilidad observada para las respuestas humorales indica que los diez ratones de estos grupos tuvieron una respuesta similar al fragmento de ClfA. En el caso de inmunizaciones con ClfA solamente, uno de los diez ratones tratados dio una respuesta negativa contra fragmento de ClfA.

Inmunización y respuesta de anticuerpos contra ICHA I 014.

Se inyectó a ratones BALB/c hembras tres veces, a intervalos de 2 semanas, 50 µg de ICHA I 014. Se detectaron anticuerpos específicos de HA y proteína A (224 - 248) por ELISA. Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con 250 ng/50 µl de HA por pocillo para la detección de anticuerpos contra el vehículo ICHA, y con 250 ng/50 µl de la proteína de fusión de fragmento de proteína A (224 -248) MBP por pocillo para la detección de anticuerpos contra el fragmento de proteína A. Después de lavar, se añadieron 150 µl de tampón de bloqueo (hidrolizado de caseína) a cada pocillo y las placas se incubaron a 20 °C durante 60 minutos. Después de lavar con PBS que contenía Tween 20 0,05 %, se añadieron diluciones dobles en serie (comenzando a 1:50) de sueros en tampón de bloqueo y se incubaron durante 1 hora a 20 °C.

Los anticuerpos unidos se detectaron por incubación de 30 minutos a 20 °C con anti IgG de ratón de cabra marcado con peroxidasa de rábano rústico (HRP). La reacción se desarrolló usando tetrametilbencidina (TMB) durante 3 minutos, la reacción enzimática se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 1 M y la absorbancia se leyó a 450 nm.

Se han representado las respuestas del anticuerpo IgG contra el vehículo y el inserto de fragmento de proteína A (224 - 248) en las gráficas A y B de la Figura 10. Los resultados indican que las inmunizaciones con ICHA 014 inducen anticuerpos específicos tanto anti HA como anti Proteína A (224 - 248). El panel C de la Figura 10 muestra el porcentaje de ratones inmunizados que desarrollan una respuesta de IgG anti HA y anti Proteína A positiva el día 70.

Se observó una respuesta de IgG anti HA y anti Proteína A (224 - 248) positivo 3 semanas (J21) después de la primera inyección de proteína. El nivel de IgG anti Proteína A (224 - 248) fue mucho menor que el del anticuerpo dirigido contra la proteína vehículo. No obstante, los inventores observaron que la respuesta humoral aumentó con el número de inyecciones. Seis semanas después de la primera inyección el nivel de IgG anti Proteína A (224 - 248) era tan alto como el del anticuerpo dirigido contra la proteína vehículo.

Para evaluar la unión de los sueros, obtenidos de los nueve ratones inmunizados con ICHA I 014, a la Proteína A completa, los inventores han desarrollado un inmunoensayo. La proteína A se une fuertemente con la región constante de las cadenas pesadas de gamma globulinas, es posible que puedan obtenerse resultados de falso positivo de la unión no específica de los anticuerpos con proteína A. Para superar esta dificultad, se usaron perlas magnéticas recubiertas con Proteína G para la inmovilización de inmunoglobulinas del suero. Se produjo unión específica en la parte Fc del anticuerpo, controlando de este modo su orientación y haciendo sus paratopos completamente disponibles para reaccionar con la Proteína A. Además, la unión de las perlas magnéticas de Proteína G con la región constante de la cadena pesada no interfirió con el sitio de unión a Proteína A en los anticuerpos, permitiendo de este modo la evaluación de los anticuerpos de Proteína A.

Se incubó proteína G conjugada con perlas magnéticas con los diferentes sueros durante 40 minutos a 20 °C. A continuación, después de la etapa de lavado que permite retirar los anticuerpos no unidos, se permitió que la solución de Proteína A-biotina recombinante se uniera durante 60 minutos a 20 °C en un volumen final de 50 µl. Después de la etapa de lavado, se realizó una incubación con estreptavidina conjugada con la HRP. Esta incubación se realizó a 20 °C durante 30 minutos. Después de la última etapa de lavado, se añadió solución de sustrato de TMB y se permitió que la reacción continuara durante 3 minutos a 20 °C. Las reacciones se detuvieron añadiendo 100 µl de H₂SO₄ 1 M. Se determinó la absorbancia de cada pocillo usando un lector de microplacas equipado con un filtro de 450 nm. Los pocillos de control contenían suero obtenido en J1, perla magnética-Proteína G y Proteína A-biotina.

Los resultados obtenidos muestran que todos los sueros obtenidos de la inmunización con ICHA I 014, contienen un anticuerpo específico que interacciona con la Proteína A a través de sus parátomos (Figura 11).

Ejemplo 7: los poliepitopos de ICHA inducen anticuerpos contra los insertos y HA en un modelo de conejo.

La ICHA I 003 purificada se usó para inmunizar conejos blancos de Nueva Zelanda. En esta construcción, se presentan dos epítomos lineales en ICHA. Debido a sus pequeños tamaños, estos epítomos no son inmunogénicos si se inyectan directamente como una forma correspondiente a péptidos pequeños. Se mezclaron 200 µg de ICHA I 003, cada uno contenido en 500 µl de PBS con un volumen igual de adyuvante completo de Freund hasta que se obtuvo una emulsión estable. Se usó un ml de esta emulsión para inmunizar a un conejo. El conejo se reforzó con tres inmunizaciones adicionales los días 14, 28 y 56. Se realizó sangrado final el día 72.

Para verificar la inducción de anticuerpos contra el vehículo y los insertos después de inmunización con ICHA I 003, se realizaron experimentos de serotitulación incubando diluciones de los sueros (suero preinmunitario y suero el día 72) presentando HA y dos proteínas de fusión de MBP distintas el epítomo SEB o TSST-1.

Las curvas de serotitulación se presentan en la Figura 12. Los datos indican que la inyección del poliepitopo estimula una respuesta humoral tanto contra la hemolisina alfa HA estafilocócica nativa como contra los dos epítomos heterólogos (SEB y TSST-1) presentados en el vehículo. Además, los resultados en la Figura 13 muestran que los anticuerpos inducidos con ICHA I 003 neutralizan completamente la actividad hemolítica de HA.

Ejemplo 8: Protección contra exposición a *S. aureus* por inmunización activa con polítopos de ICHA.

8.1 Ensayo de letalidad

Para demostrar el efecto de ICHA y sus derivados en una vacunación contra aislados de *S. aureus* altamente virulentos, se dividieron aleatoriamente ratones hembra BALB/c, de 9 semanas de edad, en jaulas limpias y se sometieron a cuarentena durante 7 días antes del inicio del estudio. Se inmunizaron grupos de 5 o 10 animales cada uno por vía subcutánea con 50 µg de polítopo de ICHA purificado, cada uno contenido en 230 µl de PBS, mezclado con un volumen de 20 µl de adyuvante QuilA a una concentración de 1 mg/ml. Los ratones de control recibieron solamente PBS. Los ratones se reforzaron con dos inmunizaciones adicionales el día 21 y el día 42 con la misma cantidad de antígeno o PBS. Se recogieron muestras sanguíneas de grupos tanto vacunados como de control antes del comienzo del experimento (día 0) y los primeros 35 y 56 días. El día 56, se expuso a los ratones por vía intraperitoneal (IP) a 8.10⁷ UFC/ml de aislado de *S. aureus* virulento 118. Se registró la morbilidad y mortalidad después de la exposición por grupo individual a las 24 y 48 horas después de la exposición (en la tabla 5 el tiempo de exposición se indica por T₀). Los datos de supervivencia por grupo tratado individual se representan en la tabla 5. En la tabla en la primera columna el número de animales por grupo se indica entre paréntesis.

Tabla 5: supervivencia de ratones inmunizados con diversas vacunas de polítopo de ICHA y exposición a cepa de *S. aureus* virulenta 118.

Grupos	T ₀	+24 h	+48 h
PBS (10)	100 %	0 %	0 %
ICHA I 000-QuilA (5)	100 %	100 %	100 %
ICHA I 012-QuilA (10)	100 %	94 %	74 %
ICHA I 013-QuilA (10)	100 %	87 %	54 %
ICHA I 014-QuilA (10)	100 %	38 %	25 %

Todos los ratones de control infectados con 8.10⁷ UFC murieron en un periodo de 24 horas después de la exposición. Por el contrario, en el grupo de ratones (5) que recibieron ICHA I 000-QuilA, no se produjo ninguna muerte hasta 48 horas después de la exposición. Además, solamente 6 % y 13 % de los ratones inmunizados con ICHA I 012-QuilA e ICHA I 013-QuilA respectivamente murieron en un periodo de 24 horas después de la exposición.

Los ratones a los que se administró Polítipo ICHA I 012-QuilA, ICHA I 013-QuilA e ICHA I 014-QuilA mostraron una protección del 74 %, 54 % y 25 % respectivamente 48 horas después de la exposición.

8.2 Evolución de las señales clínicas

Los ratones se controlaron con respecto a señales clínicas después de 24 horas y 48 horas después de la exposición. La gravedad de la enfermedad se evaluó usando una puntuación de 0 a 4 (puntuación 0: el ratón está en buena forma, se mueve con normalidad, come y bebe con normalidad y no presenta comportamientos anómalos; puntuación 1: el ratón está desanimado, se mueve lentamente, tiene el pelo seco, come y bebe con dificultad; puntuación 2: el ratón está muy desanimado, ya no se mueve, tiene el pelo muy seco, ya no come ni bebe; puntuación 3: el ratón está moribundo; y puntuación 4: el ratón ha muerto). La tabla 6 muestra la media de las puntuaciones observadas en todos los ratones de cada grupo. En la tabla en la primera columna se indica el número de animales por grupo entre paréntesis.

Tabla 6: media de las puntuaciones clínicas observadas en todos los ratones de cada grupo inmunizado con vacunas de polítipo de ICHA o PBS para el grupo de control y exposición a cepa de *S. aureus* virulenta 118.

Grupos	T ₀	+24 h	+48 h
PBS (10)	0	4	4
ICHA I 000-QuilA (5)	0	2	3
ICHA I 012-QuilA (10)	0	1,3	2,3
ICHA I 013-QuilA (10)	0	1,7	3
ICHA I 014-QuilA (10)	0	3,12	3,25

Los resultados muestran que las señales clínicas observadas relacionadas con la infección son menos importantes en los cuatro grupos inmunizados. Entre estos 4 grupos, 3 son en los que se observó menos mortalidad. Por lo tanto, 24 horas después de la exposición, los grupos inmunizados con los polítipos ICHA I 000, ICHA I 012-QuilA e ICHA I 013-QuilA presentan señales clínicas menos graves que los otros grupos.

En conclusión, los animales de control infectados con *S. aureus* eran altamente susceptibles y murieron rápidamente en comparación con animales inmunizados con vacuna de polítipo de ICHA. Los animales inmunizados con ICHA I 000-QuilA, ICHA I 012-QuilA e ICHA I 013-QuilA presentaron aún menos síntomas y señales de enfermedad y menos mortalidad.

8.3 Colonización de órganos internos

La eficacia de la vacuna se expresa convenientemente como la reducción del número de UFC por riñón o bazo en animales vacunados en comparación con control en momentos seleccionados después de la exposición.

Para determinar si la baja mortalidad observada en los ratones inmunizados estaba relacionada con carga bacteriana reducida en sus órganos, se inmunizaron cada uno de cuatro grupos de 20 BALB/c y un grupo de 5 ratones (ICHA I 000-QuilA) de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente. Los ratones de control recibieron solamente PBS. El día 56, los ratones se expusieron por vía intraperitoneal a una dosis subletal ($2,3 \times 10^7$ UFC/ml) de aislado de *S. aureus* virulento 118.

Veinticuatro horas después de la inoculación, los ratones se sacrificaron y se les realizaron necropsias. Se tomaron después el bazo y el riñón de cada animal, se pesaron y se homogeneizaron con un homogeneizador. Se sembraron diluciones de los homogeneizados en placas de agar Chapman por triplicado. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas, para recuento de bacterias. Después de la incubación, se enumeró el número de colonias de *S. aureus* y se expresó como UFC por órgano. La tabla 7 resume la recuperación de UFC de los tejidos de ratones de todos los grupos. En la tabla en la primera columna se indica el número de animales por grupo entre paréntesis.

Tabla 7: la recuperación de UFC de los tejidos de ratones de todos los grupos.

Grupos	Bazo		Riñón	
	recuento de UFC	Porcentaje de reducción	recuento de UFC	Porcentaje de reducción
PBS (20)	315	0 %	736	0 %
ICHA I 000-QuilA (5)	176	44 %	361	52 %
ICHA I 012-QuilA (20)	117	63 %	99	87 %

ICHA I 013-QuilA (20)	18	94 %	23	97 %
ICHA I 014-QuilA (20)	108	66 %	129	83 %

La recuperación de bacterias en el periodo de 24 horas después de la exposición fue aproximadamente 2 veces mayor en el bazo y en el riñón de los ratones de control expuestos a *S. aureus* que en los órganos de ratones inmunizados por polítopo de ICHA I 000.

El número bacteriano se redujo en los 2 grupos de animales inmunizados por ICHA I 012-QuilA e ICHA I 014-QuilA. La reducción fue mucho más pronunciada en el grupo de ratones inmunizado con ICHA I 013-QuilA, la recuperación de bacterias fue aproximadamente 17 veces menor en el bazo, y 32 veces menor en el riñón de los ratones inmunizados con el polítopo ICHA I 013-QuilA que en los ratones de control expuestos a *S. aureus*.

Por lo tanto, la inmunización activa que se dirige a los polítopos de ICHA protege a los animales de infección por *S. aureus*; esta protección se correlaciona con colonización microbiológica reducida.

Conclusión.

En los estudios de la presente invención se ha mostrado que la inmunización con polítopo de ICHA confirió protección contra exposición a *S. aureus* en el modelo de infección de ratón. Este ejemplo demostró que podría conseguirse una protección activa contra *S. aureus* mediante administración de polítopos derivados de proteínas ICHA recombinantes.

Ejemplo 9: fragmentos de proteína A que carecen de unión con el dominio Fc y Fab de inmunoglobulina G son insertos adecuados para ICHA.

La proteína estafilocócica A (SpA) desempeña un papel clave en la patogenia de *S. aureus*. SpA es una proteína de 42 kDa y comprende varias regiones con diferentes funciones (Figura 14): la región de repetición Wr, que se usa para tipación de *spa*, la región Wc, que confiere anclaje a la pared celular bacteriana, la secuencia de señal (región S) en la parte N terminal y los cuatro o cinco dominios de unión a inmunoglobulina G (IgG) altamente homólogos, designados E, D, A, B y C que comparten el 65 - 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos (Figura 15). El dominio Z de SpA presentado en la bibliografía es un análogo modificado por ingeniería genética del dominio de unión a IgG B. El tamaño de estos dominios es relativamente pequeño; cada uno contiene ~ 58 restos de aminoácidos. Las estructuras de solución de estos dos dominios, los dominios B y E, así como el dominio Z muy similar, se han determinado por espectroscopia de RMN. Estos análisis estructurales han revelado que estos dominios de unión a IgG adoptan un plegamiento de haz de tres hélices "arriba-abajo" clásico. La cristalografía y los estudios de RMN han indicado que la hélice 1 y la hélice 2 interactúan con la parte Fc de Ig mientras que la hélice 2 y hélice 3 se unen con el dominio Fab de Ig. Estos estudios también han indicado que la actividad de unión de los dominios de unión a Ig de SpA requiere la presencia de las tres hélices y depende de su estructura tridimensional.

La actividad de unión de SpA actúa para cubrir la célula bacteriana con IgG, bloqueando de este modo cualquier interacción con receptores de Fc en neutrófilos y obstaculizando la fagocitosis. La capacidad de SpA para unirse con la parte Fc de inmunoglobulinas permite escapar al sistema inmunitario y provocar un agotamiento del repertorio de linfocitos B.

Además, los ensayos de inmunización realizados por los presentes inventores usando ICHA I 009 han confirmado que la presentación de un dominio de unión a Ig funcional de SpA en ICHA no desencadenaba la inducción de anticuerpos anti SpA (datos no mostrados).

Modificación por ingeniería genética de poliepítopos derivados de SpA relacionados con ICHA I.

Los epítopos de SpA heterólogos presentados en ICHA I están enumerados en la tabla 2. Los polítopos resultantes están enumerados y descritos en la tabla 3. Los poliepítopos ICHA I 009, ICHA I 012, ICHA I 013 e ICHA I 014 corresponden al dominio de longitud completa E (aminoácido 187 a aminoácido 248), hélice 1 (aa 187 - 205), hélice 2 (aa 206 - 223) y hélice 3 (aa 224 - 248) de SpA, respectivamente. Los cuatro poliepítopos se han producido y purificado como se ha descrito en el ejemplo 3.

Para analizar adicionalmente las características de unión a IgG del dominio de unión a inmunoglobulina completo y las tres hélices α del dominio SpA, los cuatro poliepítopos se han ensayado con respecto al reconocimiento del anticuerpo IgG de ratón en experimentos de ELISA.

Se han recubierto placas de ELISA de microtitulación (Nunc-Immuno Plate, Roskilde, Dinamarca) con los cuatro polítopos de ICHA derivados de SpA (250 ng/pocillo) en tampón de recubrimiento (tampón de bicarbonato-carbonato 0,05 M, pH 9,6) y se incubaron durante una noche a 4 °C. La proteína ICHA I 000 se tomó como control. Las placas se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 0,05 % (PBST) y se

5 bloquearon con 150 μ l de hidrolizado de caseína 3 % en PBS durante 1 hora a 37 °C. El anticuerpo monoclonal de ratón IgG anti ClfA diluido en serie 100 veces y 1000 veces en PBST se incubó en pocillos (50 μ l/pocillo) durante 1 hora a 37 °C. Los pocillos se lavaron tres veces con PBST. Los anticuerpos unidos se detectaron por incubación de 1 hora a 37 °C con IgG de cabra anti ratón marcado con peroxidasa de rábano rústico (HRP). La reacción se desarrolló usando tetrametilbencidina (TMB) durante 10 minutos, la reacción enzimática se detuvo mediante adición de H₂SO₄ 1 M y la absorbancia se leyó a 450 nm.

10 Las reactividades de ELISA de los polítopos de ICHA derivados de SpA se muestran en la Figura 16. Estas indican que el dominio E de SpA presentado en ICHA (ICHA I 009) aún era capaz de interactuar con IgG. Por el contrario, ICHA I 012, ICHA I 013 e ICHA I 014 eran claramente no reactivos. Estos indican que el truncamiento del dominio de unión a Ig de SpA era insuficiente para anular la unión con IgG.

15 Una conclusión importante que podría extraerse de estos resultados es que la capacidad de SpA para interactuar con la región Fc de moléculas de inmunoglobulina estaba ausente en la hélice α individual de los dominios de SpA.

En los estudios de la presente invención se ha mostrado que la vacunación activa con ICHA I 009 no confería protección contra *S. aureus* en ensayos de exposición (datos no mostrados). Por el contrario, la vacunación con los polítopos ICHA I 012, ICHA I 013 e ICHA I 014 protegió a los animales de infección por *S. aureus* (véase ejemplo 8).

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Université de Liège Centre d'Economie Rurale Université Libre de Bruxelles

25 <120> Un polipéptido de hemolisina alfa recombinante de *Staphylococcus aureus*, que tiene una deleción en el dominio del tallo y secuencias heterólogas insertadas

<130> P22277WO

<150> EP 09 150 888.7

30 <151> 19-01-2009

<160> 78

<170> PatentIn versión 3.3

35 <210> 1

<211> 293

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

40 <220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(293)

<223> hemolisina alfa de tipo silvestre

45 <400> 1

ES 2 483 720 T3

Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly Ser
 1 5 10 15

Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu Asn
 20 25 30

Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn His
 35 40 45

Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly Gln
 50 55 60

Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala Trp
 65 70 75 80

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

Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Glu Tyr
 100 105 110

Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr Gly Asp Asp

ES 2 483 720 T3

115	120	125
Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly His 130	135	140
Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser Pro 145	150	155 160
Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val Asn 165	170	175
Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro Val Tyr Gly 180	185	190
Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala Asp 195	200	205
Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Phe 210	215	220
Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala Ser Lys 225	230	235 240
Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg Asp Asp Tyr 245	250	255
Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr Lys Asp 260	265	270
Lys Trp Thr Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp Trp Glu Lys 275	280	285
Glu Glu Met Thr Asn 290		

5 <210> 2
 <211> 879
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

10 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(879)
 <223> gen que codifica hemolisina alfa de tipo silvestre

<400> 2
 gcagattctg atattaatat taaaaccggg actacagata ttggaagcaa tactacagta 60

ES 2 483 720 T3

```

aaaacaggtg atttagtcac ttatgataaa gaaaatggca tgcacaaaaa agtattttat 120
agttttatcg atgataaaaa tcacaataaa aaactgctag ttattagaac gaaagggtacc 180
attgctggtc aatatagagt ttatagcgaa gaaggtgcta acaaaagtgg tttagcctgg 240
ccttcagcct ttaaggtaca gttgcaacta cctgataatg aagtagctca aatatctgat 300
tactatccaa gaaattcgat tgatacaaaa gagtatatga gtactttaac ttatggatcc 360
aacggtaatg ttactggtga tgatacagga aaaattggcg gccttattgg tgcaaatggt 420
tcgattggtc atacactgaa atatgttcaa cctgatttca aaacaatttt agagagccca 480
actgataaaa aagtaggctg gaaagtgata tttacaataa tggatgaatca aaattgggga 540
ccatatgata gagattcctg gaaccggta tatggcaatc aacttttcat gaaaactaga 600
aatggttcta tgaaagcagc agataacttc cttgatccta acaaagcaag ttctctatta 660
tcttcagggt tttcaccaga cttegtaca gttattacta tggatagaaa agcatccaaa 720
caacaaacaa atatagatgt aatatacgaa cgagttcgtg atgattacca attgcattgg 780
acttcaacaa attggaaagg taccaatact aaagataaat ggacagatcg ttcttcagaa 840
agatataaaa tcgattggga aaaagaagaa atgacaaaat 879

```

5
<210> 3
<211> 257
<212> PRT
<213> Artificial

10
<220>
<223> hemolisina alfa mutada (ICHA I)

15
<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(257)
<223> hemolisina alfa mutada (ICHA I)

<400> 3

```

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

Ser Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Gly Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu
                20           25           30

Asn Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn
            35           40           45

His Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly
    50           55           60

```

ES 2 483 720 T3

Gln Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Thr
65 70 75 80

Trp Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val
85 90 95

Ala Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Pro Gly Asn
100 105 110

Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser Pro Thr Asp Lys Lys Val Gly
115 120 125

Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val Asn Gln Asn Trp Gly Pro Tyr
130 135 140

Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro Val Tyr Gly Asn Gln Leu Phe Met Lys
145 150 155 160

Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala Asp Asn Phe Leu Asp Pro Asn
165 170 175

Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Phe Ser Pro Asp Phe Ala Thr
180 185 190

Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala Ser Lys Gln Gln Thr Asn Ile Asp
195 200 205

Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg Asp Asp Tyr Gln Leu His Trp Thr Ser
210 215 220

Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr Lys Asp Lys Trp Ile Asp Arg Ser
225 230 235 240

Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp Trp Glu Lys Glu Glu Met Thr Asn Lys
245 250 255

Leu

<210> 4
<211> 771
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> gen que codifica hemolisina alfa mutada (ICHA I)

<400> 4

ES 2 483 720 T3

atggcagatt ctgatattaa tattaaaacc ggtactacag atattggaag caatactaca 60
 gtaaaaacag gtggtttagt cacttatgat aaagaaaatg gcatgcacaa aaaagtattt 120
 tatagtttta tcgatgataa aaatcataat aaaaaactgc tagttattag aacgaaaggt 180
 accattgctg gtcaatatag agtttatagc gaagaagggt ctaacaaaag tggtttaacc 240
 tggccttcag cctttaaggt acagttgcaa ctacctgata atgaagtagc tcaaatatct 300
 gattactatc caagaaattc gattgatccc ggaaccctg atttcaaac aattttagag 360
 agcccaactg ataaaaaagt aggctggaaa gtgatattta acaatatggt gaatcaaat 420
 tggggacat atgatagaga ttcttggaa ccggtatatg gcaatcaact tttcatgaaa 480
 actagaaatg gctctatgaa agcagcagat aacttccttg atcctaacaa agcaagttct 540
 ctattatctt cagggtttcc accagacttc gctacagtta ttactatgga tagaaaagca 600
 tccaaacaac aaacaaatat agatgtaata tacgaacgag ttcgtgatga ctaccaattg 660
 cactggactt caacaaattg gaaaggtacc aataactaaag ataaatggat agatcgttct 720
 tcagaaagat ataaaatcga ttgggaaaaa gaagaaatga caaataagct t 771

<210> 5
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> hemolisina alfa mutada (ICHA II)

10

<400> 5

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

ES 2 483 720 T3

Asp Asn Glu Glu Leu Val Ala Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn
 100 105 110

Ser Ile Asp Pro Gly Asn Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Phe Glu
 115 120 125

Ser Pro Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met
 130 135 140

Val Asn Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro Val
 145 150 155 160

Tyr Gly Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala
 165 170 175

Ala Asp Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Ser
 180 185 190

Gly Phe Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala
 195 200 205

Ser Ala Ser Lys Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val
 210 215 220

Arg Asp Asp Tyr Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr
 225 230 235 240

Asn Thr Lys Asp Lys Trp Ile Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile
 245 250 255

Asp Trp Glu Lys Glu Glu Met Thr Asn Lys Leu
 260 265

<210> 6
 <211> 801
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> gen que codifica hemolisina alfa mutada (ICHA II)

10

<400> 6

ES 2 483 720 T3

atggcagatt ctgatattaa tattaaaacc ggtactacag atattggaag caatactaca 60
 gtaaaaacag gtgatttagt cacttatgat aaagaaaatg gatccggcat gcacaaaaaa 120
 gtattttata gttttatcga tgatctgcag aaaaatcata ataaaaaact gctagttatt 180
 agaacgaaag gtaccattgc tggccaatat agagtttata gcgaagaagg tgctaacaaa 240
 agtgggttaa cctggccttc agcctttaag gtacagttgc aactacctga taatgaagag 300
 ctcgtagctc aaatatctga ttactatcca agaaattoga ttgatccggg gaaccctgat 360
 ttcaaaacaa ttttagaatt cgagagccca actgataaaa aagtaggctg gaaagtgata 420
 tttacaata tggatgaatca aaattgggga ccatatgata gagattcttg gaaccggta 480
 tatggcaatc aacttttcat gaaaactaga aatggctcta tgaaagcagc agataacttc 540
 cttgatccta acaaagcaag ttctctatta tcttcagggt tttcaccaga ctctgctaca 600
 gttattacta tggatagaaa agctagcgca tccaaacaac aaacaaatat agatgtaata 660
 tacgaacgag ttcgtgatga ctaccaattg cactggactt caacaaattg gaaaggtacc 720
 aatactaaag ataaatggat agatcgttct tcagaaagat ataaaatcga ttgggaaaaa 780
 gaagaaatga caaataagct t 801

5 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 7

Lys Lys Lys Val Thr Ala Gln Glu Leu Asp
 1 5 10

15 <210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 8

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

25 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 9

ES 2 483 720 T3

Phe Pro Ser Pro Tyr Tyr Ser Pro Ala Phe Thr Lys Gly Glu Lys
 1 5 10 15

5 <210> 10
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 10

Gly Met Ser Asn Glu Glu Tyr Asn Lys Leu Thr Glu Asp Lys Lys Glu
 1 5 10 15

Pro Leu Leu Asn Lys Phe Gln Ile Thr Thr Ser Pro Gly Ser Thr Gln
 20 25 30

Lys Ile Leu Thr Ala Met Ile Gly Leu Asn Asn Lys Thr Leu Asp Asp
 35 40 45

Lys Thr Ser Tyr Lys Ile Asp Gly Lys Gly Trp Gln Lys Asp Lys Ser
 50 55 60

Trp Gly Gly Tyr Asn Val Thr Arg Tyr Glu Val Val
 65 70 75

15 <210> 11
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 11

25 Gly Gly Ile Lys Lys Val Lys Gln Arg Leu Lys Glu Leu Gly Asp Lys
 1 5 10 15

Val Thr Asn Pro Val Arg Tyr Glu Ile Glu Leu Asn Tyr Tyr Ser Pro
 20 25 30

Lys Ser Lys Lys Asp Thr Ser Thr Pro Ala Ala Phe Gly Lys Thr Leu
 35 40 45

Asn Lys Leu Ile Ala Asn Gly Lys Leu
 50 55

30 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 483 720 T3

<220>
 <223> péptido sintético
 <400> 12
 5 Lys Tyr Glu Gln Gly Gly Asn Ile Val Asp Ile Asp Phe Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Pro
 <210> 13
 <211> 13
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 15 <400> 13
 Gln Phe Gly Gly His Asn Ser Val Asp Phe Glu Asp Thr
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> péptido sintético
 25 <400> 14
 Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile
 1 5 10 15
 Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly
 20 25 30
 Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro
 35 40 45
 Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
 30 50 55
 <210> 15
 <211> 62
 <212> PRT
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 40 <400> 15

ES 2 483 720 T3

Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
1 5 10 15

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
20 25 30

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys
35 40 45

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Glu Glu Asp Asn Lys Lys
50 55 60

5 <210> 16
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> péptido sintético
<400> 16

Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
1 5 10 15

Leu Pro Asn

15 <210> 17
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> péptido sintético
<400> 17

Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp
1 5 10 15

25 Pro Ser

30 <210> 18
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético
35 <400> 18

ES 2 483 720 T3

<220>
<223> péptido sintético

5 <400> 23

Ile Asp Asp Lys Asn His
1 5

<210> 24
<211> 8
10 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

15 <400> 24

Ile Asp Asp Leu Gln Lys Asn His
1 5

<210> 25
<211> 6
20 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido sintético

25 <400> 25

Asp Asn Glu Val Ala Gln
1 5

30 <210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> péptido sintético

<400> 26

Asp Asn Glu Glu Leu Val Ala Gln
1 5

40 <210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> péptido sintético

<400> 27

50 Ser Ile Asp Pro Gly Asn Pro Asp Phe
1 5

<210> 28
<211> 6
55 <212> PRT
<213> Artificial

ES 2 483 720 T3

<220>
 <223> péptido sintético
 <400> 28
 5
 Ile Leu Glu Ser Pro Thr
 1 5
 <210> 29
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> péptido sintético
 15
 <400> 29
 Ile Leu Glu Phe Glu Ser Pro Thr
 1 5
 20
 <210> 30
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 30
 Asp Arg Lys Ala Ser Lys
 1 5
 30
 <210> 31
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 31
 Asp Arg Lys Ala Ser Ala Ser Lys
 1 5
 40
 <210> 32
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> péptido artificial
 50
 <400> 32
 Lys Glu Glu Met Thr Asn
 1 5
 55
 <210> 33
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<210> 39
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 39
 10 tttttgtgc atgccggatc catttcttt atcata 36
 <210> 40
 <211> 36
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 20 <400> 40
 agttttatcg atgatctgca gaaaaatcat aataaa 36
 <210> 41
 <211> 36
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 30 <400> 41
 ttattatga ttttctgca gatcatcgat aaaact 36
 <210> 42
 <211> 36
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador sintético
 <400> 42
 ttcaaacaa ttttagaatt cgagagccca actgat 36
 45 <210> 43
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 43
 55 atcagttggg ctctcgaatt ctaaattgt ttgaa 36
 <210> 44
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 44
 65 actatggata gaaagctag cgcattcaaaa caacaa 36

ES 2 483 720 T3

<210> 45
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 45
 10 ttgtgttg gatgcgctag ctttctatc catagt 36
 <210> 46
 <211> 36
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 20 <400> 46
 ttgcactgga cttcagagct cacaaattgg aaaggt 36
 <210> 47
 <211> 36
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 30 <400> 47
 accttccaa ttgtgagct ctgaagtcca gtgcaa 36
 <210> 48
 <211> 45
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador sintético
 <400> 48
 ggatgggcaa aaagaaagtg acagcgcagg agcttgacgc catgg 45
 45 <210> 49
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 49
 55 ccatggcgtc aagctcctgc gctgtcact tcttttgcc catgg 45
 <210> 50
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 50
 65 aagcttttc cgagtccta ttagccct gcttttaca aaggggaaaa gctt 54

ES 2 483 720 T3

<210> 51
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 51
 10 aagctttcc cctttgtaa aagcagggct ataataagga ctcgaaaaa gctt 54
 <210> 52
 <211> 36
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 20 <400> 52
 ttctgttg atttagcact acgttcgaca tttat 36
 <210> 53
 <211> 36
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 30 <400> 53
 tggtagctct ggaatgggtt caattcacc aggctc 36
 <210> 54
 <211> 60
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 40 <400> 54
 45 aagctcaaa ctaataagaa aaagtgact gctcaagaat tagattacct aactaagct 60
 <210> 55
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 55
 55 aagcttagt aggtaacta attcttgagc agtcacctt ttcttattag ttggaagct 60
 <210> 56
 <211> 102
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 65 <400> 56

ES 2 483 720 T3

	tggtcgaaat atgaacaagg tggcaatatt gtagatatcg atttcgacag tgtacctcaa	60
	ttcgggtggac acaatagtgt tgactttgaa gatacacgtc aa	102
5	<210> 57 <211> 102 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador sintético <400> 57	
	ttgacgtgta tcttcaaagt caacactatt gtgtccaccg aattgaggta cactgtcgaa	60
	atcgatatct acaatattgc caccttgttc atatttcgac ca	102
15	<210> 58 <211> 36 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador sintético	
25	<400> 58 tgtgcgggca tgagtaacga agaataat aaatta	36
30	<210> 59 <211> 36 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador sintético <400> 59 cccacatacc acttcatagc gtgtaacggt gtaacc	36
40	<210> 60 <211> 36 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador sintético <400> 60 ggtggaatca aaaaagftaa acaacgtcta aaagaa	36
50	<210> 61 <211> 39 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> cebador sintético <400> 61 taattttcca ttggcgataa gttattaag ggtcttacc	39
60	<210> 62 <211> 36 <212> ADN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador sintético	
5	<400> 62	
	aacaattca acaaagaaca acaaaatgct ttctat	36
	<210> 63	
10	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador sintético	
	<400> 63	
	tttttggtg tcttctctt ttggtgcttg agcatc	36
20	<210> 64	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> cebador sintético	
	<400> 64	
30	aacaattca acaaagaaca acaaaatgct ttctat	36
	<210> 65	
	<211> 30	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador sintético	
40	<400> 65	
	gtaggtaaa tgtaaagttt catagaaagc	30
	<210> 66	
	<211> 30	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador sintético	
50	<400> 66	
	taactgaaga acaacgtaac ggcttcatcc	30
	<210> 67	
55	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador sintético	
60	<400> 67	
	tgatggatcg tctttaggc ttggatgaa	30
	<210> 68	
65	<211> 30	
	<212> ADN	

ES 2 483 720 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 5
 <400> 68
 gtgagcaaag aaatttagc agaagctaaa 30
 <210> 69
 10 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> cebador sintético
 <400> 69
 tttttgtg tcttctctt ttggtgctg agcatc 36
 <210> 70
 20 <211> 111
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> cebador sintético
 <400> 70
 aagcttcaaa ctaataagaa aaaggtgact gctcaagaat tagattacct aactgggagc 60
 30 gggtttccga gtccttatta tagccctgct tttacaaaag gggaaaagct t 111
 <210> 71
 <211> 111
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 40 <400> 71
 aagcttttcc ccttttgtaa aagcagggtc ataataagga ctcggaacc cgctcccagt 60
 taggtaatct aattcttgag cagtcacctt tttcttatta gtttgaagct t 111
 <210> 72
 45 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> cebador sintético
 <400> 72
 aagcttaaat atgaacaagg tggcaatatt gtagat 36
 <210> 73
 55 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>

ES 2 483 720 T3

<223> cebador sintético

<400> 73

aagcttgta tctcaaagt caacactatt gtgtcc 36

5

<210> 74

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> péptido sintético

<400> 74

15

Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala

35

40

45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 75

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> péptido sintético

25

<400> 75

Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55

30

<210> 76

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 483 720 T3

<220>

<223> péptido sintético

<400> 76

5

Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys
50 55 60

<210> 77

<211> 57

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

15

<400> 77

Met Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu
1 5 10 15

Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser
20 25 30

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

Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
50 55

20

<210> 78

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> péptido sintético

<400> 78

ES 2 483 720 T3

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala
50

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante de *Staphylococcus aureus*, que tiene una delección en el dominio del tallo para eliminar la actividad hemolítica, **caracterizado por que** se inserta al menos una secuencia heteróloga en una región seleccionada del grupo que consiste en regiones definidas por la posición de aminoácidos 108 a 151, posición de aminoácidos 1 a 5, posición de aminoácidos 288 a 293, posición de aminoácidos 43 a 48, posición de aminoácidos 235 a 240, posición de aminoácidos 92 a 97, posición de aminoácidos 31 a 36, posición de aminoácidos 156 a 161 con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1, a condición de que, si la secuencia heteróloga contiene cinco o más restos de histidina consecutivos, el grupo de la secuencia heteróloga distinto del grupo representado por dichos cinco o más restos de histidina consecutivos tiene una longitud mínima de 11 restos de aminoácido; o una variante del mismo, en el que además de dicha delección en el dominio del tallo y dicha inserción de secuencia heteróloga, se añaden, sustituyen o suprimen de 1 a 50 restos de aminoácido con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1 y tiene la actividad para formar oligómeros y para unirse con bicapas lipídicas, incluyendo monocapas lipídicas y bicapas lipídicas, o membranas celulares.
2. El polipéptido de hemolisina alfa recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia heteróloga tiene una longitud mínima de 5 restos de aminoácido, preferentemente al menos 8, 10, 12, 15, 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 300 restos de aminoácido.
3. El polipéptido de hemolisina alfa recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la secuencia heteróloga o las secuencias heterólogas deriva(n) exclusivamente de especies de *Staphylococcus*, preferentemente *Staphylococcus aureus*.
4. El polipéptido de hemolisina alfa recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia heteróloga o las secuencias heterólogas se selecciona(n) del grupo que consiste en SEB (enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*), TSST (toxina del síndrome de choque tóxico), FnBP (proteína de unión a fibronectina), BlaZ (β lactamasa), ClfA (Factor de Aglutinamiento A), PBP2a (proteína de unión a penicilina 2a), Proteína A, todas derivadas de especies de *Staphylococcus*, preferentemente *Staphylococcus aureus*.
5. Un medicamento o una vacuna que comprenden un polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante de *Staphylococcus aureus*, que tiene una delección en el dominio del tallo para eliminar la actividad hemolítica, en el que se inserta al menos una secuencia heteróloga en un bucle expuesto al disolvente del polipéptido de hemolisina alfa, en el que la secuencia heteróloga o las secuencias heterólogas se selecciona(n) de especies de *Staphylococcus*, preferentemente *Staphylococcus aureus*; o una variante del mismo, en el que además de dicha delección en el dominio del tallo y dicha inserción de secuencia heteróloga, se añaden, sustituyen o suprimen de 1 a 50 restos de aminoácido con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1 y tiene la actividad para formar oligómeros y para unirse con bicapas lipídicas, incluyendo monocapas lipídicas y bicapas lipídicas, o membranas celulares.
6. El medicamento o la vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la al menos una secuencia heteróloga se inserta en una región seleccionada del grupo que consiste en regiones definidas por la posición de aminoácidos 108 a 151, posición de aminoácidos 1 a 5, posición de aminoácidos 288 a 293, posición de aminoácidos 43 a 48, posición de aminoácidos 235 a 240, posición de aminoácidos 92 a 97, posición de aminoácidos 31 a 36, posición de aminoácidos 156 a 161, preferentemente en una región definida por la posición de aminoácidos 108 a 151, con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1.
7. Un polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante de *Staphylococcus aureus*, que tiene una delección en el dominio del tallo para eliminar la actividad hemolítica, **caracterizado por que** se inserta al menos una secuencia heteróloga en un sitio permisivo, y por que la secuencia heteróloga comprende un fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de Proteína A de especies de *Staphylococcus*, preferentemente de *Staphylococcus aureus*; en el que dicho fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de Proteína A tiene un tamaño mínimo de 5 restos de aminoácido y no tiene actividad de unión o tiene actividad de unión reducida con el dominio Fc o Fab de inmunoglobulina G en comparación con la Proteína A de longitud completa; o una variante del mismo, en el que además de dicha delección en el dominio del tallo y dicha inserción de secuencia heteróloga, se añaden, sustituyen o suprimen de 1 a 50 restos de aminoácido con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1 y tiene la actividad para formar oligómeros y para unirse con bicapas lipídicas, incluyendo monocapas lipídicas y bicapas lipídicas, o membranas celulares.
8. El polipéptido de hemolisina alfa recombinante de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la Proteína A tiene una longitud de 5 a 35 restos de aminoácido, preferentemente de 5 a 30 restos de aminoácido, más preferentemente de 10 a 30 restos de aminoácido, y aún más preferentemente de 10 a 25 restos de aminoácido y/o en el que el fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la Proteína A abarca no más de dos hélices alfa completas.
9. El polipéptido de hemolisina alfa recombinante de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, en el que el sitio

- 5 permisivo se localiza dentro de un bucle expuesto a disolvente, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en regiones definidas por la posición de aminoácidos 108 a 151, posición de aminoácidos 1 a 5, posición de aminoácidos 288 a 293, posición de aminoácidos 43 a 48, posición de aminoácidos 235 a 240, posición de aminoácidos 92 a 97, posición de aminoácidos 31 a 36, posición de aminoácidos 156 a 161 con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1.
- 10 10. El polipéptido de hemolisina alfa recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el dominio del tallo se encuentra dentro de la secuencia de aminoácidos de Thr109 a Gln150 con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1 y se retira parcial o completamente.
- 15 11. El polipéptido de hemolisina alfa recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el resto de hemolisina alfa tiene las secuencias SEC ID N°: 3 (ICHA I) o SEC ID N°: 5 (ICHA II), o variantes de las mismas en el que el resto de hemolisina alfa tiene un 85 %, preferentemente un 90 %, más preferentemente un 95 % o más identidad de aminoácidos con respecto a las secuencias SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 5.
- 20 12. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de hemolisina alfa recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 12.
- 25 14. Un transformante que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 12 o el vector de acuerdo con la reivindicación 13.
- 30 15. Un medicamento o una vacuna que comprenden un polipéptido de hemolisina alfa monocatenario recombinante de *Staphylococcus aureus*, que tiene una delección en el dominio del tallo para eliminar la actividad hemolítica, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado por que** se inserta al menos una secuencia heteróloga en un sitio permisivo, y por que la secuencia heteróloga comprende un fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la Proteína A de especies de *Staphylococcus*, preferentemente de *Staphylococcus aureus*; en el que dicho fragmento del dominio de unión a inmunoglobulina G de la Proteína A tiene un tamaño mínimo de 5 restos de aminoácidos y no tiene actividad de unión o tiene actividad de unión reducida con el dominio Fc o Fab de inmunoglobulina G en comparación con la Proteína A de longitud completa;
- 35 o una variante del mismo, en el que además de dicha delección en el dominio del tallo y dicha inserción de secuencia heteróloga, se añaden, sustituyen o suprimen de 1 a 50 restos de aminoácido con respecto a la secuencia de tipo silvestre SEC ID N°: 1 y tiene la actividad para formar oligómeros y para unirse con bicapas lipídicas, incluyendo monocapas lipídicas y bicapas lipídicas, o membranas celulares.

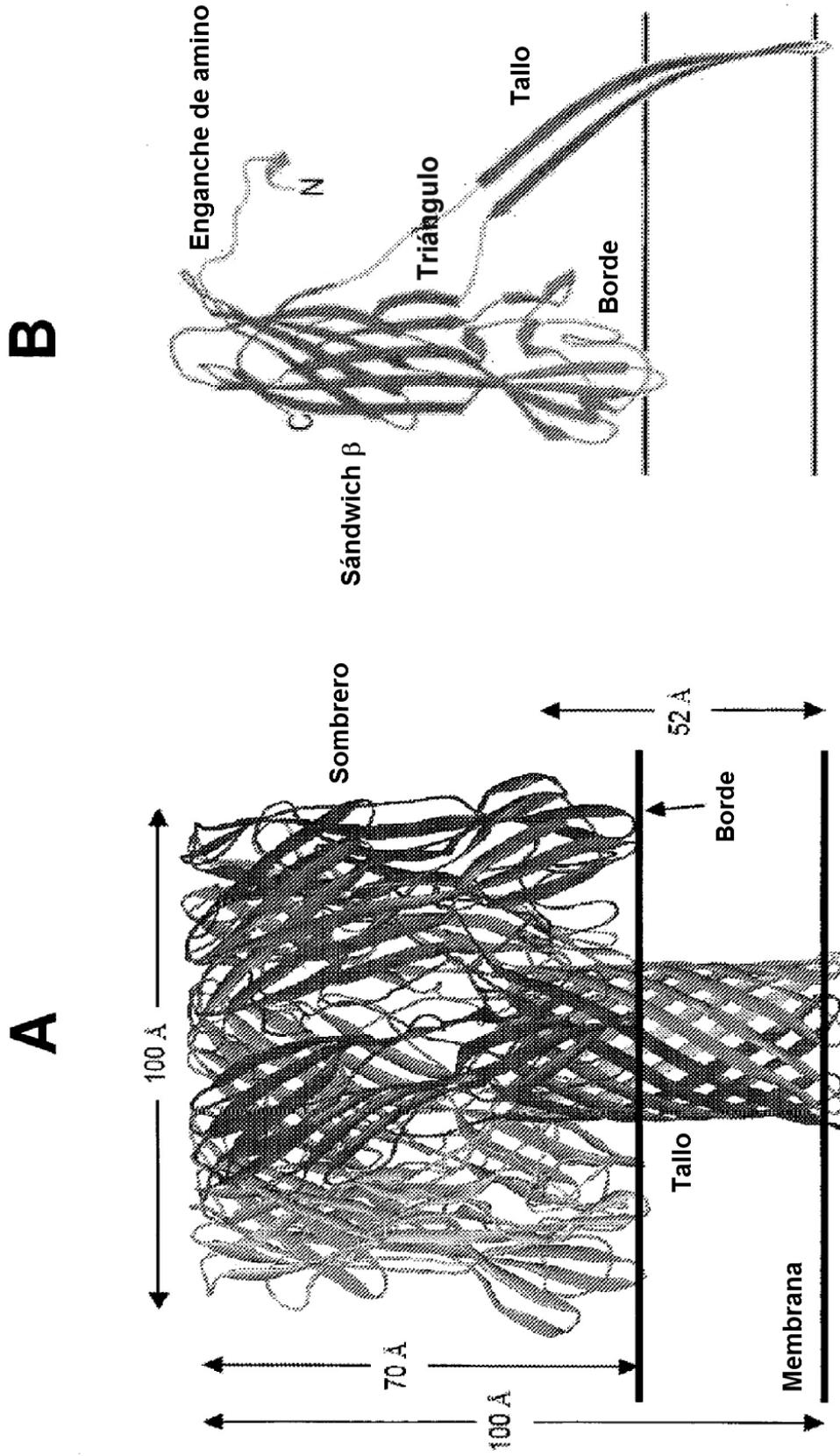


Fig. 1.

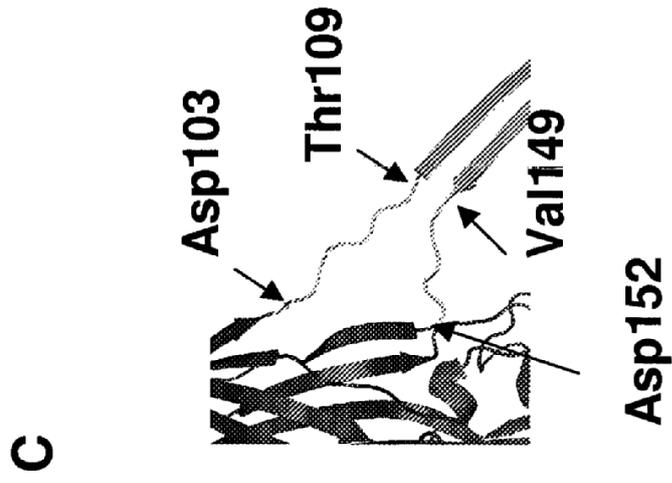


Fig. 1

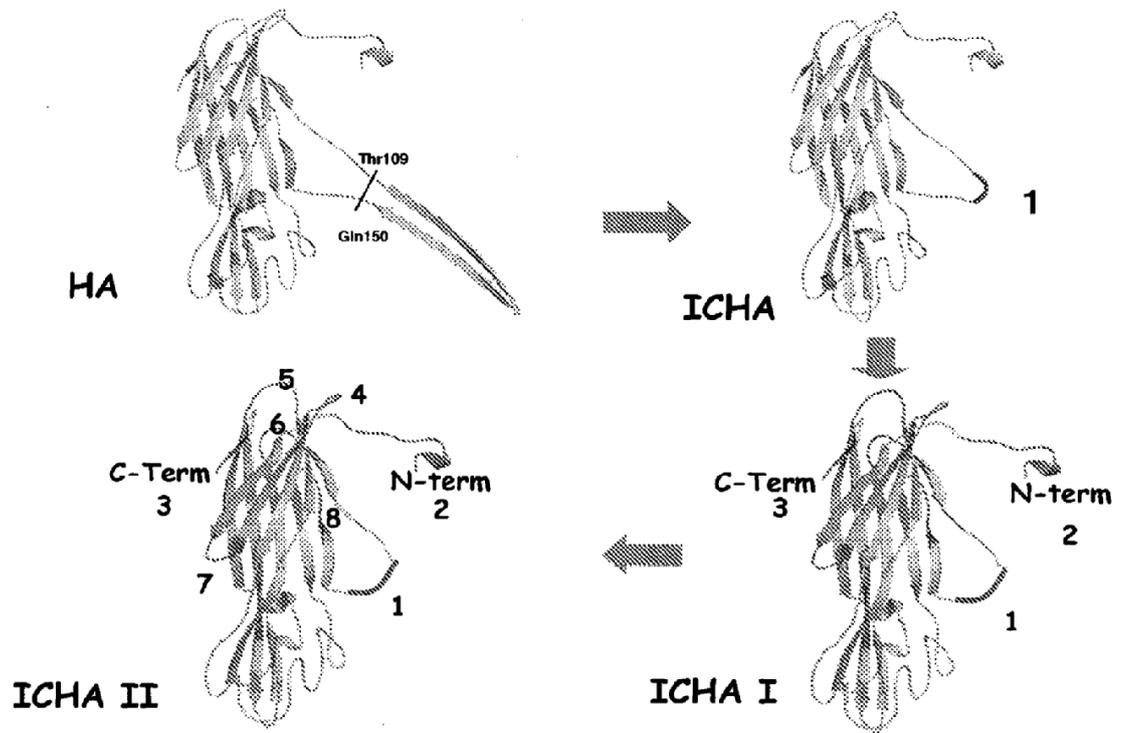


Fig. 2

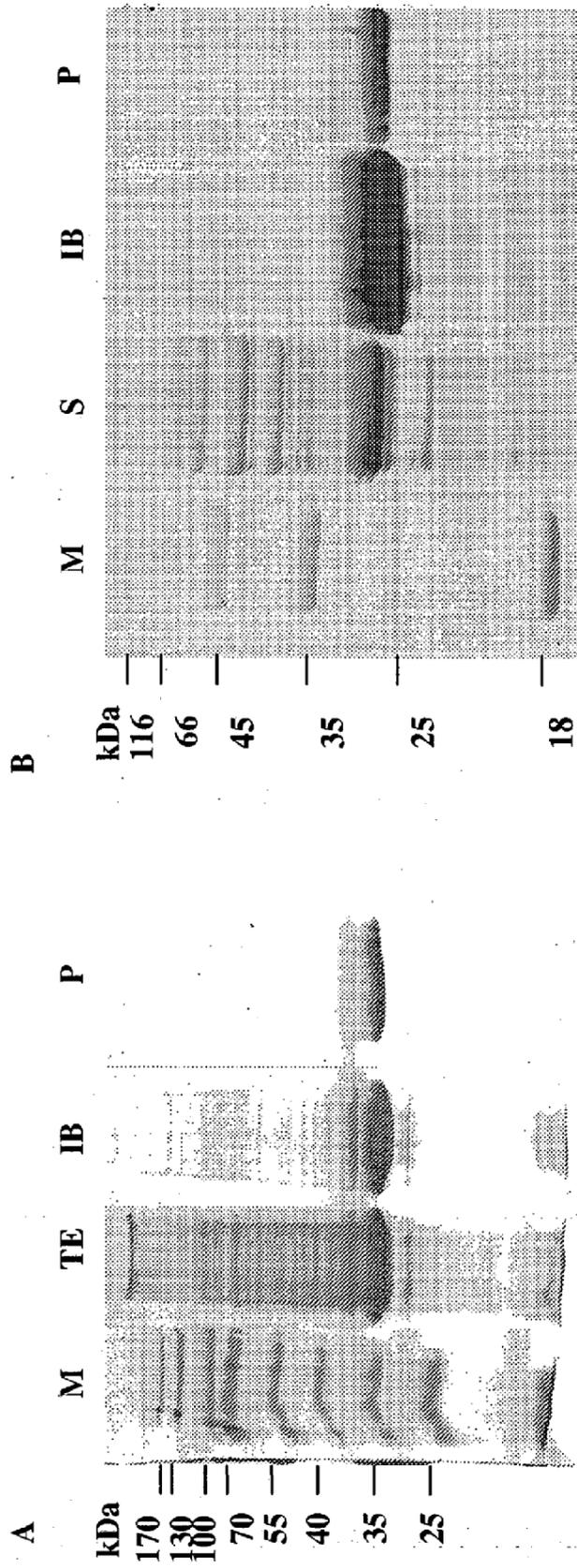


Fig. 3

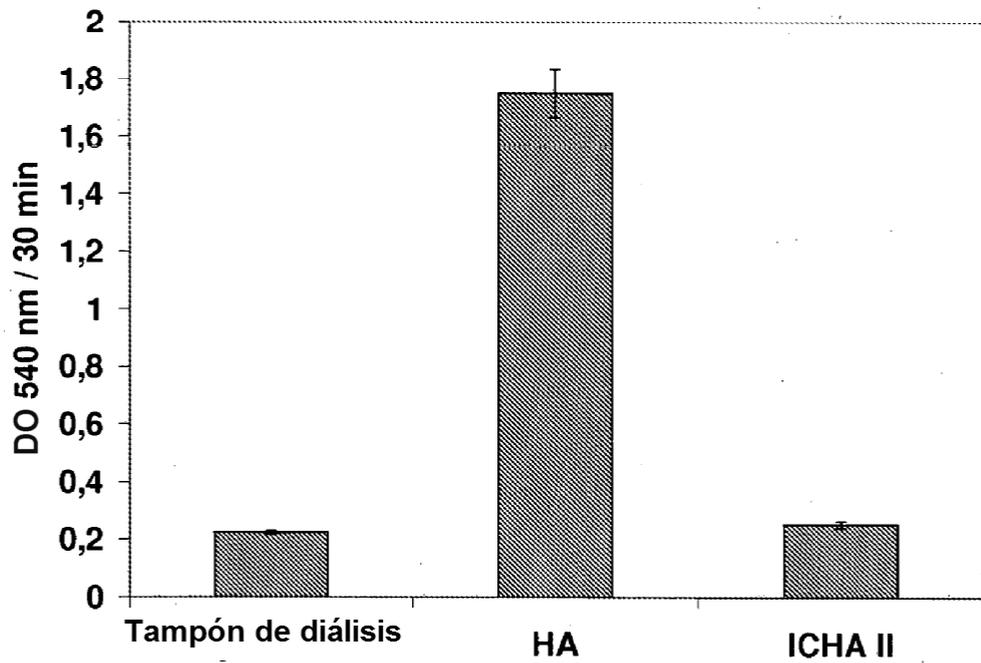
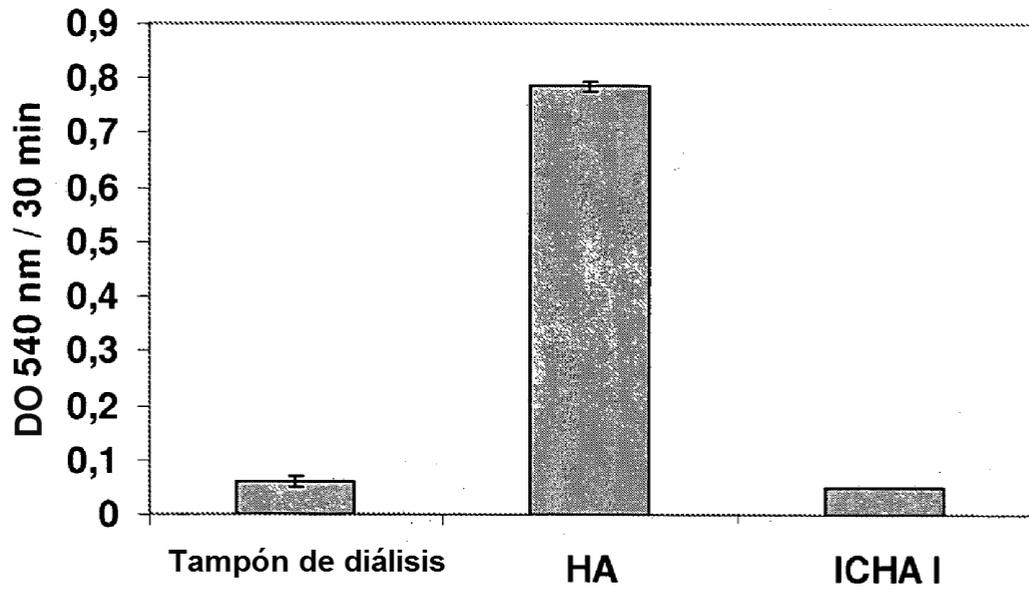


Fig. 4

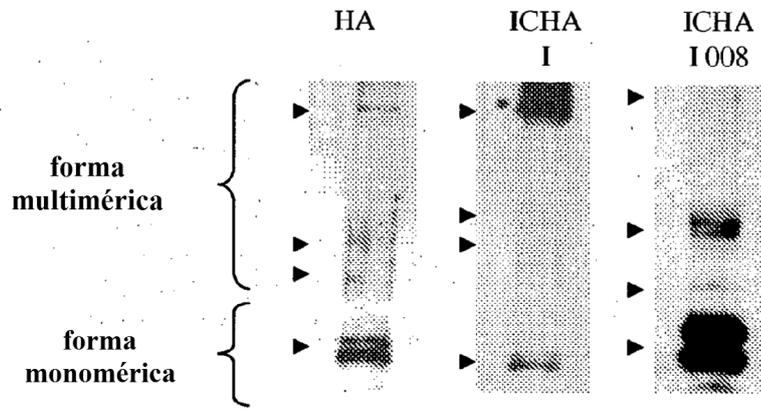
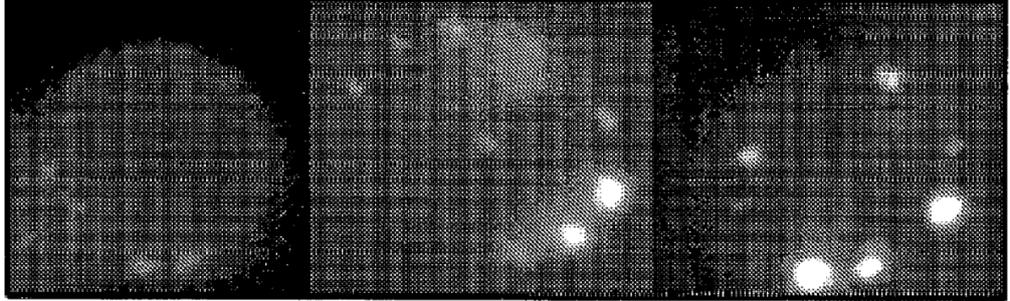


Fig. 5

HA



ICHA I

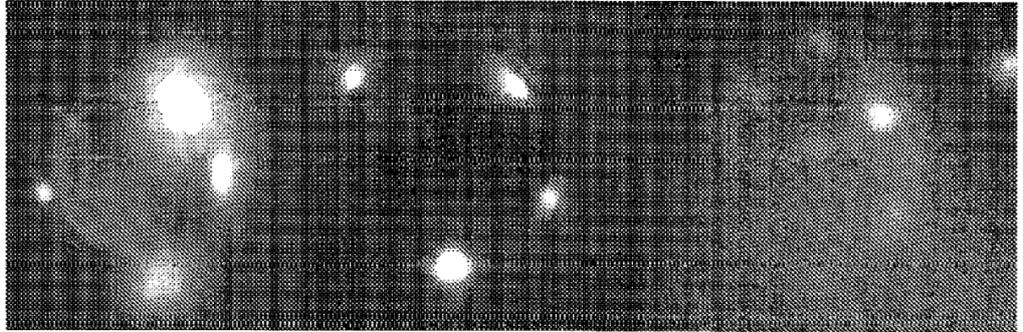


Fig. 6

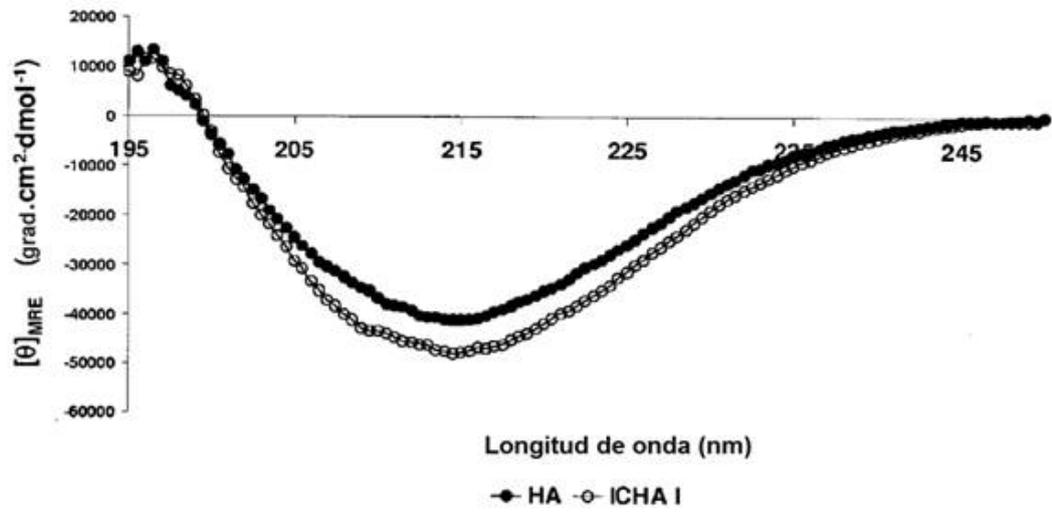


Fig. 7

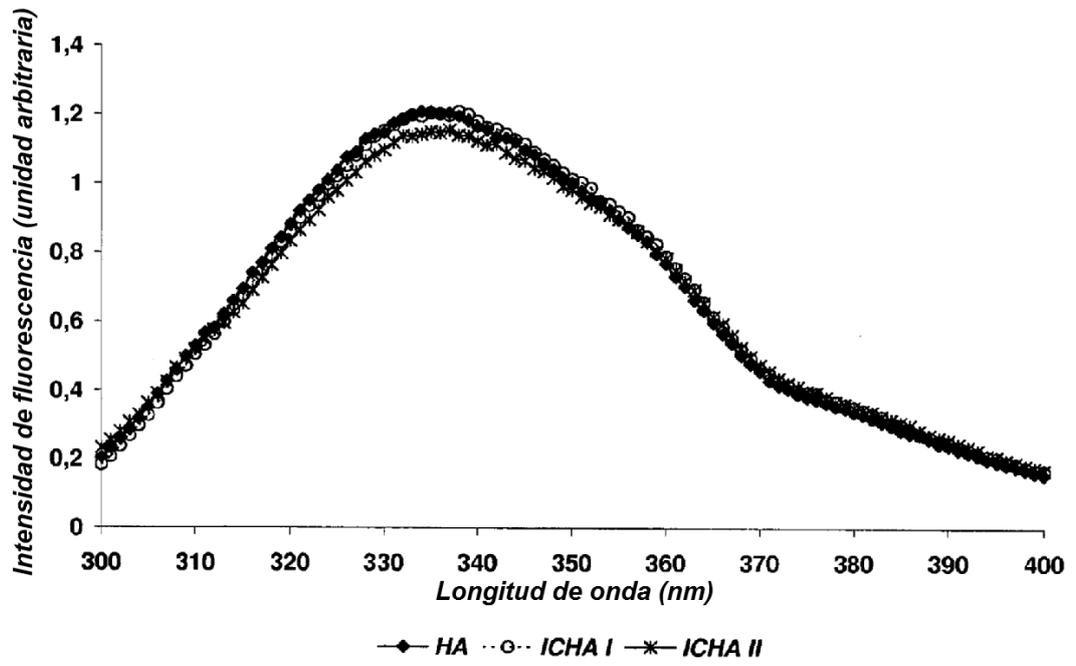
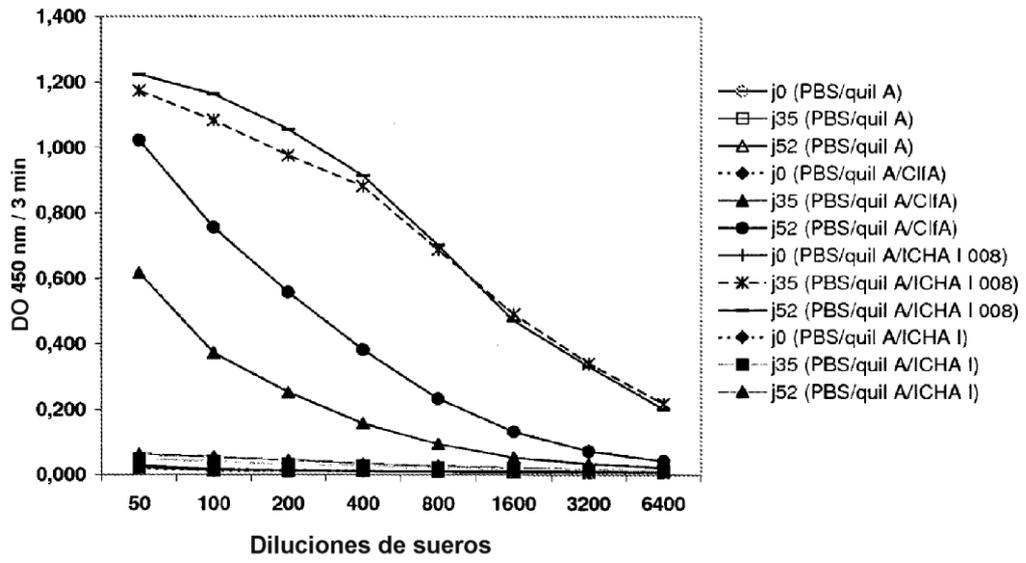


Fig. 8

A.



B.

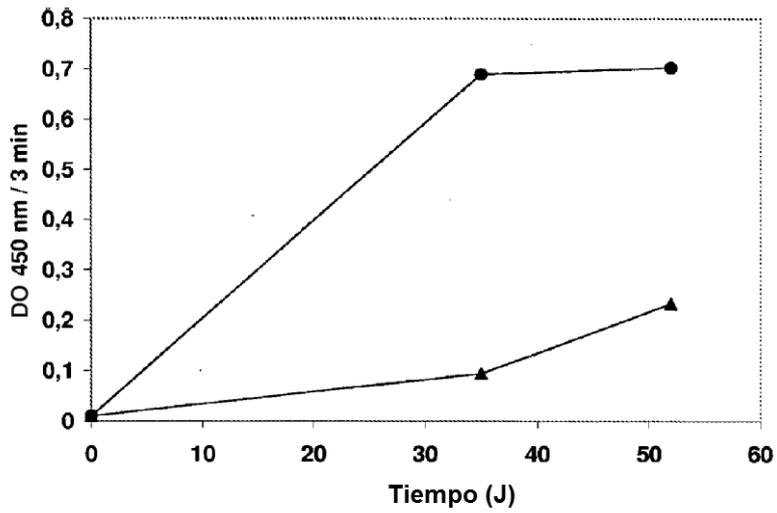


Fig. 9

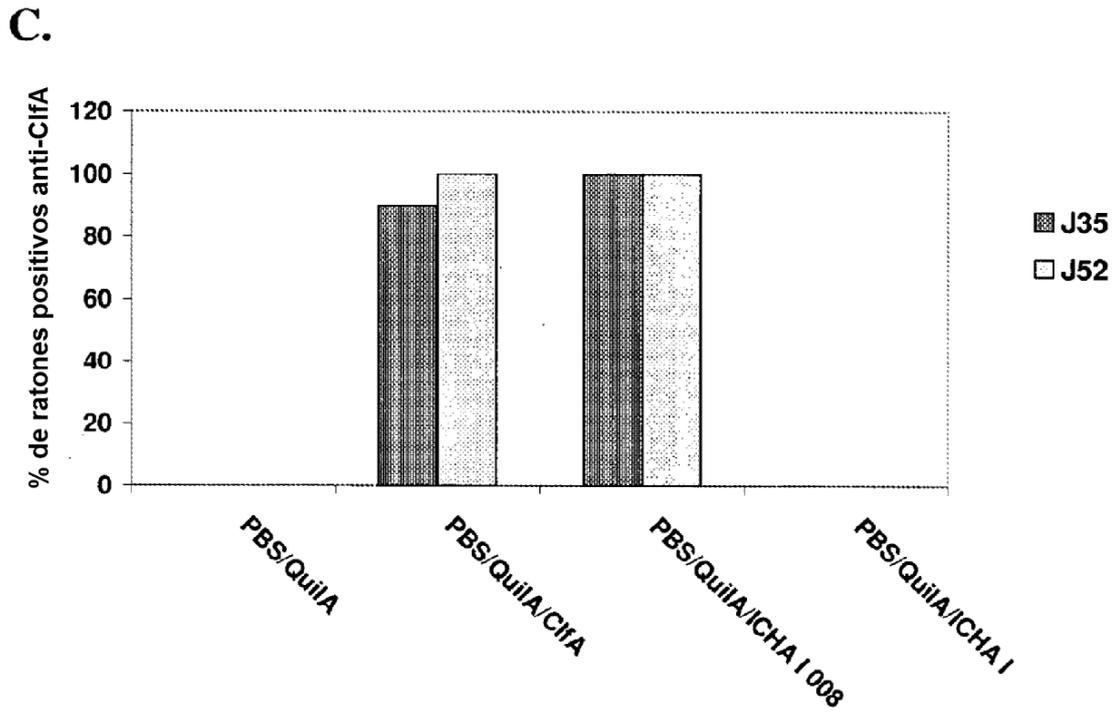
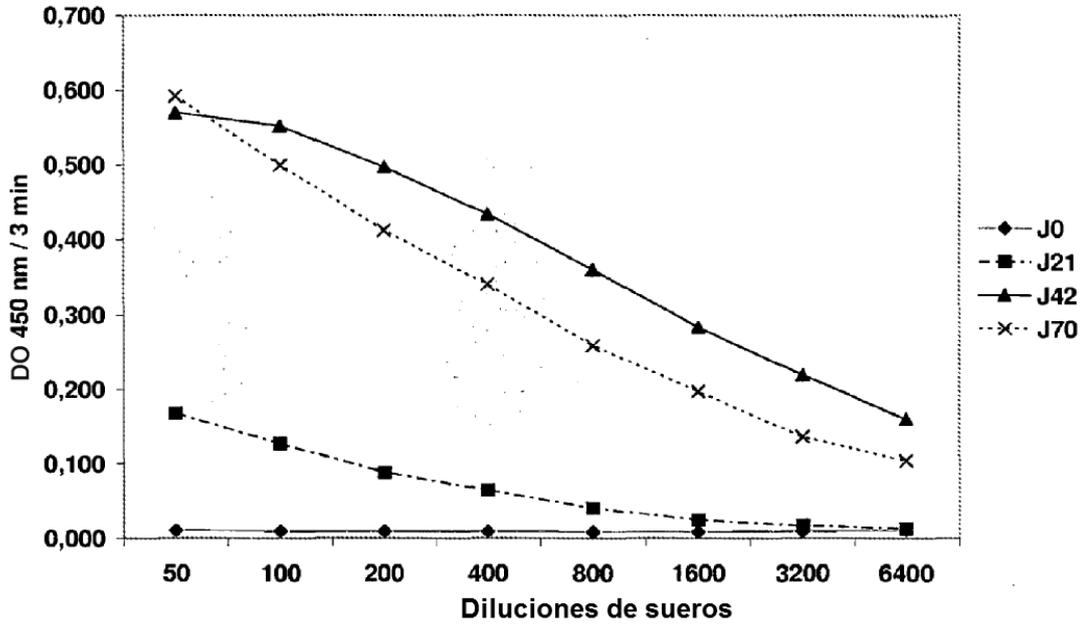


Fig. 9

A.

Serotitulación de IgG total anti-HA



B.

Serotitulación de IgG total anti-proteína A (224 - 248)

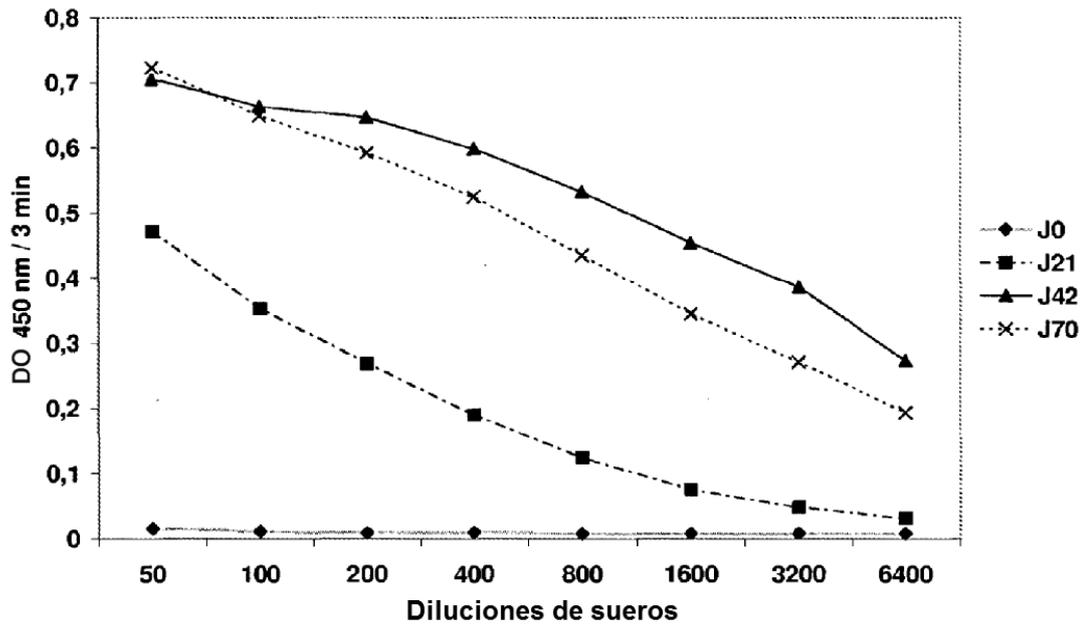


Fig. 10

C.

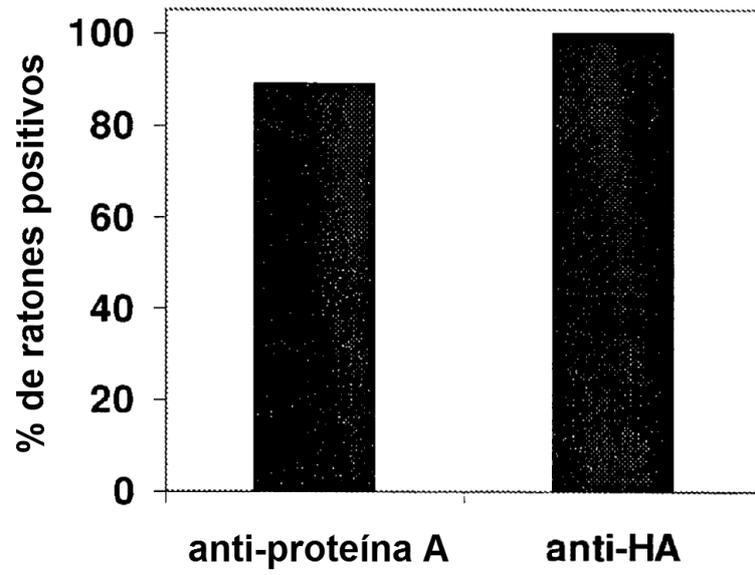
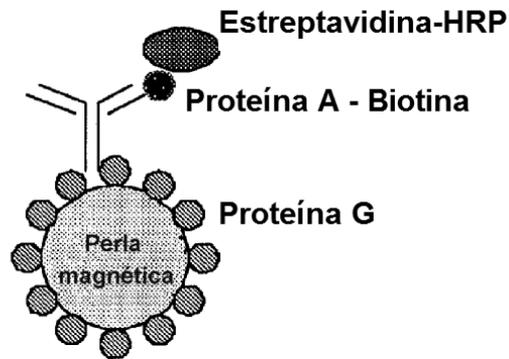


Fig. 10

A



B

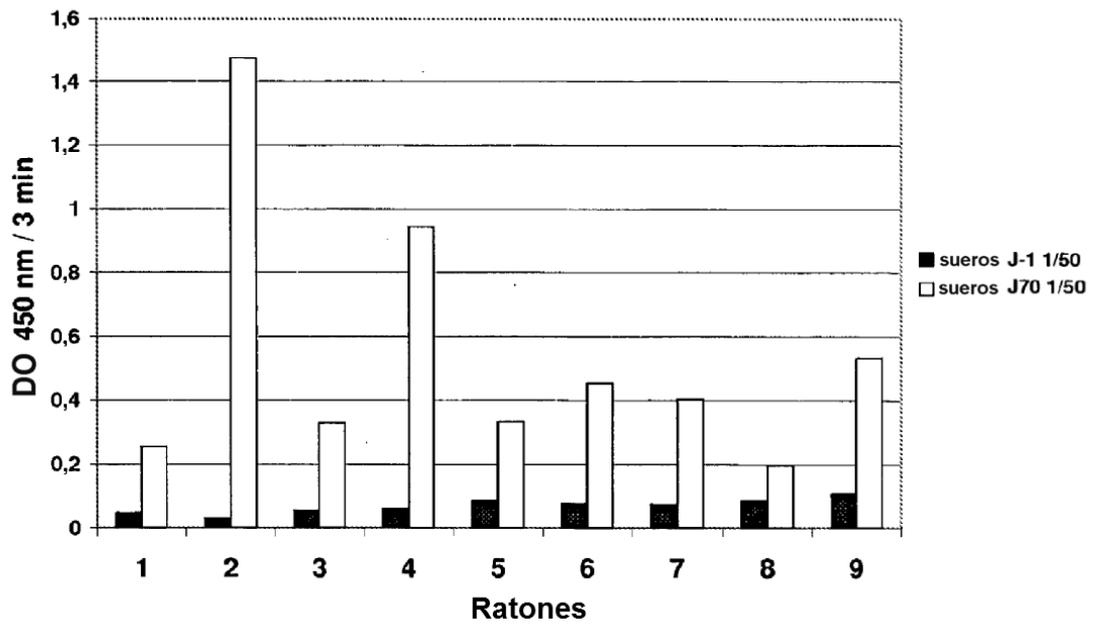


Fig. 11

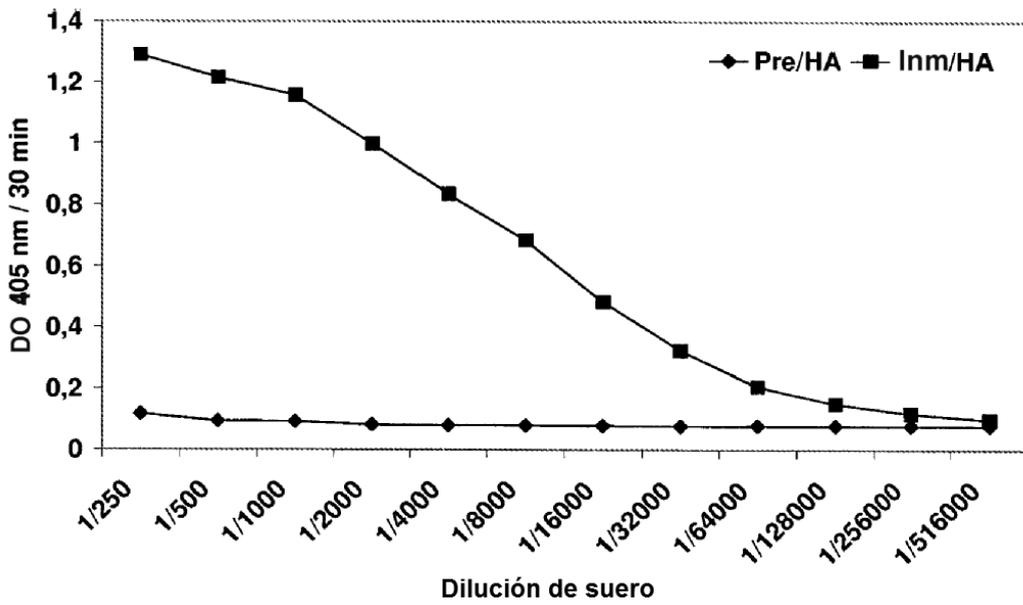
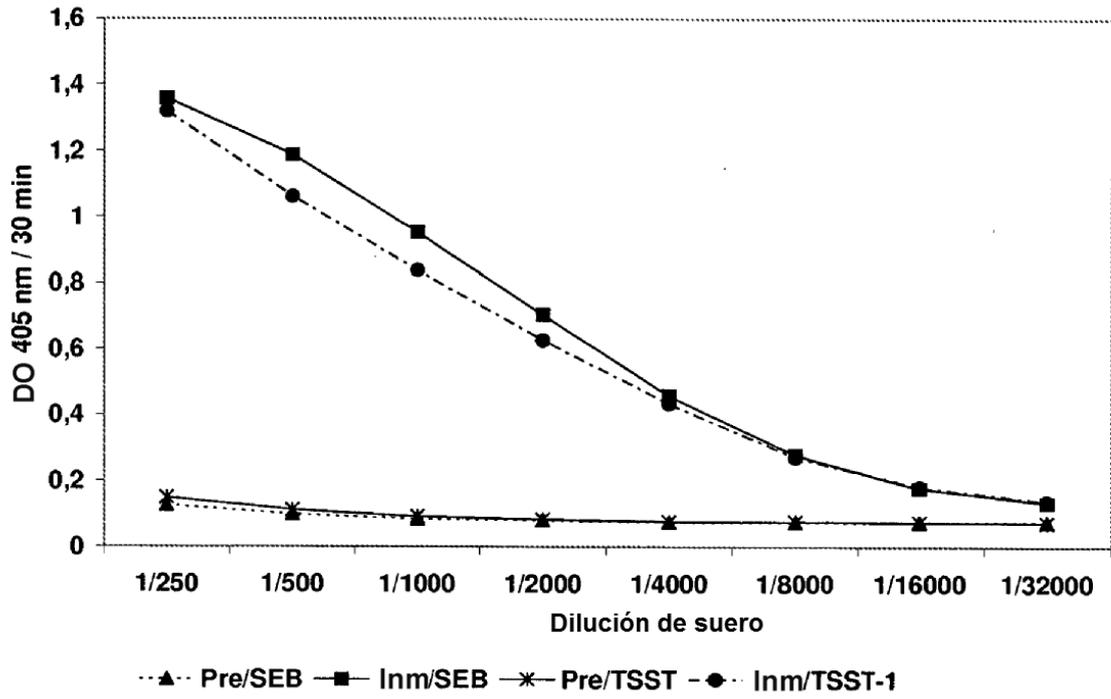


Fig. 12

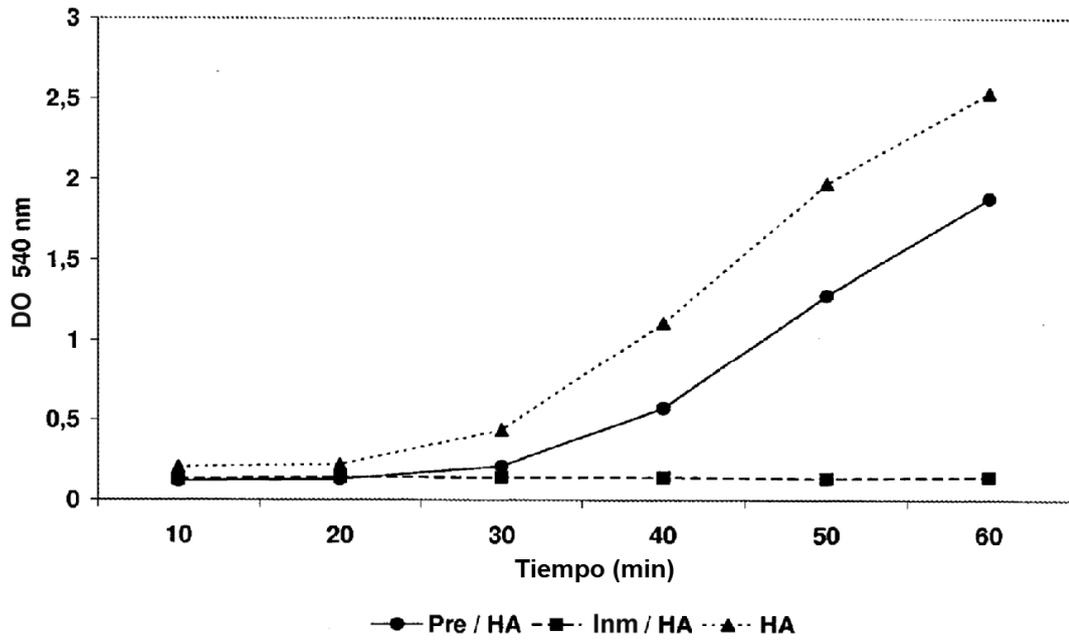


Fig. 13

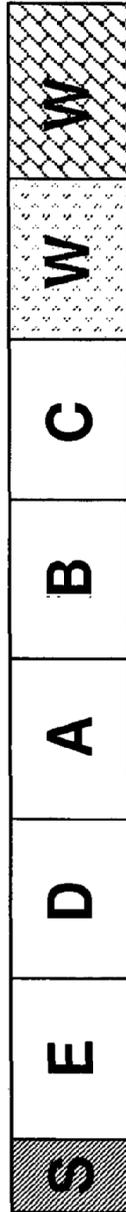


Fig. 14

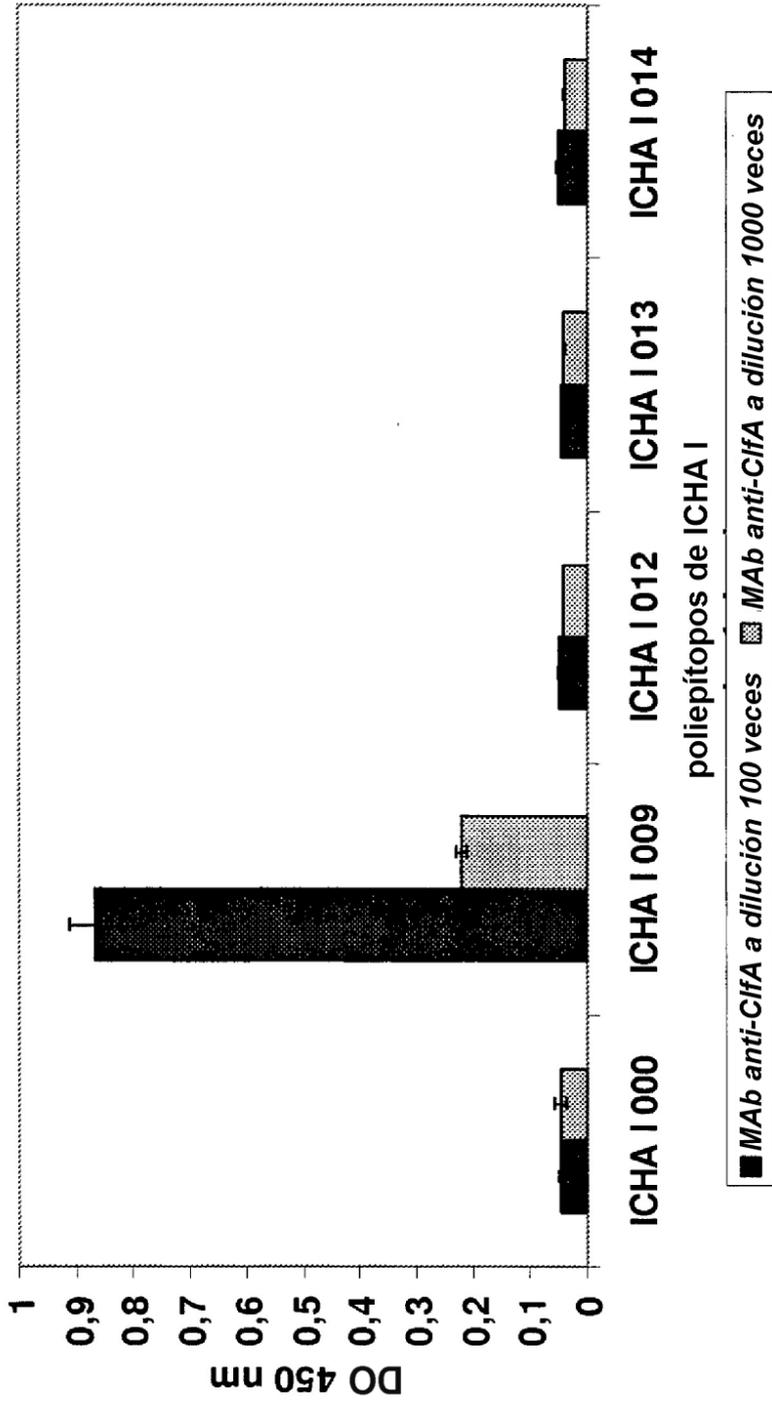


Fig. 16