(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 529 175**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)
A61K 39/085 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2010 E 10743037 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2464665**

(54) Título: **Anticuerpo monoclonal humano contra la toxina alfa derivada de S. aureus y su uso en el tratamiento o la prevención de la formación de abscesos**

(30) Prioridad:

10.08.2009 EP 09010311
03.12.2009 US 266330 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2015

(73) Titular/es:

ARIDIS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
5941 Optical Court
San Jose, CA 95138, US

(72) Inventor/es:

RUDOLF, MICHAEL y
KOCH, HOLGER

(74) Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 529 175 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

Anticuerpo monoclonal humano contra la toxina alfa derivada de *S. aureus* y su uso en el tratamiento o la prevención de la formación de abscesos.

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal humano específico para la toxina alfa de *S. aureus*, a un hibridoma que lo produce, a ácidos nucleicos que codifican para él y a células huésped transfectadas con el mismo. Además, la presente invención se refiere a métodos para producir dicho anticuerpo monoclonal. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo o al menos un ácido nucleico que codifica para dicho anticuerpo. Además, la presente invención se refiere al uso de dicho anticuerpo monoclonal para tratar o prevenir la formación de abscesos.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es una bacteria esférica, Gram positiva, anaerobia facultativa que se considera que es un patógeno oportunista. *S. aureus* coloniza comúnmente la nariz, piel y superficies de la mucosa del tracto gastrointestinal de seres humanos sanos. Aproximadamente el 20-30% de la población está colonizada con *S. aureus* en un momento determinado. Estas bacterias a menudo provocan infecciones leves, tales como granos y furúnculos en individuos sanos. Normalmente, las barreras de la mucosa y la epidermis (piel) protegen contra las infecciones por *S. aureus*. La interrupción de estas barreras naturales como resultado de lesiones, tales como quemaduras, traumatismo o procedimientos quirúrgicos, aumenta considerablemente el riesgo de infección y podría provocar infecciones graves y/o sistémicas. Enfermedades que comprometen el sistema inmunitario (por ejemplo, diabetes, nefropatía terminal, cáncer, SIDA y otras infecciones virales), pero también terapias inmunosupresoras, como por ejemplo radioterapias, quimioterapias y terapias de trasplante, aumentan el riesgo de infección. Las infecciones oportunistas por *S. aureus* pueden volverse bastante graves, provocando endocarditis, bacteriemia, osteomielitis y formación de abscesos, lo que podría dar como resultado morbilidad o mortalidad grave. Las infecciones por *S. aureus* pueden dividirse en infección localizada, tal como neumonía, e infecciones por *S. aureus* clínicamente más complejas, tales como infecciones del torrente circulatorio y formación de abscesos provocados por propagación a órganos distantes.

S. aureus es una causa principal de infecciones del torrente circulatorio, piel, tejido blando y vías respiratorias inferiores en todo el mundo. Las frecuencias de infecciones tanto intrahospitalarias como extrahospitalarias han aumentado continuamente a lo largo de los años. Además, el tratamiento de estas infecciones se ha vuelto más desafiante debido a la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos. En países desarrollados tales como los Estados Unidos, la resistencia a antibióticos β-lactámicos en cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) es un problema principal en hospitales y otros entornos de asistencia sanitaria. Particularmente, la tasa de incidencia de todas las infecciones invasivas por MRSA, incluyendo las extrahospitalarias, es alta en comparación con otros patógenos bacterianos y el 20% de estas infecciones da como resultado la muerte. Además, la aparición de resistencia adquirida a vancomicina limitó adicionalmente las opciones de tratamiento para infecciones graves por *S. aureus*.

S. aureus tiene un arsenal variado de factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad. Éstos pueden subdividirse en términos generales en proteínas de superficie y secretadas extracelulares. Las proteínas de superficie incluyen tanto componentes estructurales de la pared celular bacteriana, tales como peptidoglicano y ácido lipoteicoico, como proteínas de superficie expresadas de manera preferente durante el crecimiento exponencial, incluyendo proteína A, proteína de unión a fibronectina y factor de aglutinación. Las proteínas secretadas se expulsan generalmente de las células bacterianas durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano e incluyen varias toxinas tales como toxina alfa (también conocida como hemolisina alfa), enterotoxina B, leucocidinas (incluyendo leucocidina de Panton-Valentine PVL), lipasa y proteasa V8. Aún a pesar del amplio conocimiento acerca de las propiedades bioquímicas y moleculares de estas toxinas, no se entiende en su totalidad el papel preciso de las toxinas en la patogénesis de infecciones por *S. aureus*.

La evidencia experimental y los datos epidemiológicos han sugerido que entre otras citotoxinas, la toxina alfa puede estar implicada en la patogénesis de la neumonía (Mc Elroy *et al*, 1999). Se piensa que la toxina alfa atrae a receptores de superficie de células huésped sensibles y que se une así a la superficie celular. Este acontecimiento promueve la oligomerización de toxinas dando lugar a un pre-poro heptamérico y la inserción de una estructura de β-barril con un diámetro de poro de 2 nm en la membrana plasmática. La formación del poro provoca pérdida de integridad de membrana, que desestabiliza las células y conduce en última instancia a apoptosis y lisis celular. En particular, linfocitos, macrófagos, células epiteliales alveolares, endotelio pulmonar y eritrocitos son sensibles a la formación de poros por la toxina alfa; sin embargo, los granulocitos y fibroblastos parecen resistentes a la lisis (McElroy *et al*., 1999).

No se entiende completamente el papel exacto de la toxina alfa en la respuesta inflamatoria y la inducción de respuesta inmunitaria innata a infecciones bacterianas. *S. aureus* expresa otros diversos factores de virulencia y hasta la fecha no se entiende completamente la contribución de cada factor de virulencia a la manifestación de enfermedad y representa un desafío al desarrollo de profilaxis y terapia de una infección por *S. aureus* clínicamente compleja.

Se conoce que la toxina alfa es uno de los factores de virulencia para el establecimiento de infecciones por *S.*

aureus en el huésped y varios estudios han resaltado la importancia de la toxina alfa en una enfermedad, por ejemplo la instilación de toxina alfa purificada en tejido pulmonar de conejo o rata desencadena fuga vascular e hipertensión pulmonar, lo que se ha atribuido a la liberación de diferentes moléculas de señalización (por ejemplo, fosfatidilinositol, óxido nítrico, prostanoides y tromboxano A_2). En la bibliografía se ha mostrado que la inmunidad anti-toxina alfa es protectora contra los efectos perjudiciales de la toxina (Menzies *et al*, Infect Immun 1996, 64: 1839-1841), pero diseñar vacunas contra la toxina alfa sigue siendo un desafío significativo.

Wardenburg y Schneewind (2008) demostraron que la gravedad de una neumopatía en ratones se correlaciona con los niveles de toxina alfa producidos por un aislado de *S. aureus* particular. Además, los autores mostraron que la inmunización contra una variante de toxina alfa que no forma poros inducía inmunidad frente a neumonía provocada por *S. aureus*. Estos hallazgos son compatibles con un estudio del mismo grupo que demuestra que la toxina alfa es importante para la patogénesis de la neumonía por CA-MRSA (*S. aureus* resistente a la meticilina extrahospitalario). En otro entorno, los autores demostraron que anticuerpos frente a toxina alfa también protegían células epiteliales pulmonares humanas frente a lisis inducida por *S. aureus* (Wardenburg y Schneewind (2008)).

Aunque estos resultados indican que la toxina alfa contribuye a la destrucción del tejido pulmonar, aún no está claro si la muerte de los animales en los experimentos descritos anteriormente resultó de la destrucción directa de células pulmonares por la toxina, de una respuesta inflamatoria en exceso o de ambos. La transferencia pasiva de anticuerpos frente a toxina alfa reducía significativamente los niveles circulantes de interleucina 1β, una citocina que se sabe que acompaña a una lesión pulmonar aguda. Por tanto, es razonable concluir que la respuesta inflamatoria puede contribuir al daño pulmonar mediado por toxina alfa.

Durante una infección localizada tal como neumonía en seres humanos, aproximadamente el 40% de los pacientes con neumonía por *S. aureus* desarrolla infecciones del torrente circulatorio y enfermedad diseminada. La diseminación de la infección bacteriana puede conducir a una infección del torrente circulatorio y propagación a órganos distantes. La infección del torrente circulatorio puede conducir a septicemia, una complicación de progreso rápido y frecuentemente mortal de infecciones por *S. aureus*.

La diseminación de una infección por *S. aureus* también se observa comúnmente en modelos animales de neumonía por *S. aureus*, de nuevo desarrollando aproximadamente el 40% de los animales bacteriemia diseminada debido a daño tisular y propagación de la infección a través de capas epiteliales en el torrente circulatorio y tejido linfático. No obstante, la diseminación depende en gran parte de los antecedentes genéticos de la variedad de animal usada y del potencial del sistema inmunitario innato, tal como activación de neutrófilos, para controlar el crecimiento, por ejemplo los animales C57B/L con neutrófilos reducidos son altamente propensos a pielonefritis con *S. aureus* mientras que los animales inmunocompetentes son resistentes a infecciones. En contraposición, los animales A/J eran muy propensos, debido principalmente a un reclutamiento retardado de neutrófilos al riñón (von Köckritz-Blickwede, 2008).

Aunque los datos sobre la estructura y la función de proteínas de *S. aureus* han sido cada vez más completos, el desarrollo de una vacuna eficaz sigue siendo un desafío.

Se realizó un intento para conferir de manera segura inmunidad frente a la toxina alfa y bacterias de *S. aureus* mediante el uso de composiciones que comprendían una combinación de anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno de toxina alfa de *S. aureus* y anticuerpos que se unen específicamente a otro antígeno bacteriano (documento WO 2007/145689). Estas composiciones, aunque comprenden cantidades de anticuerpo que no son eficaces por sí mismas, no obstante neutralizan la infección y/o proporcionan protección contra la infección mediante la actividad sinérgica de la combinación de anticuerpos.

Se demuestra la eficacia protectora de dicha combinación de anticuerpos neutralizantes de la toxina de *S. aureus* toxina y opsónicos a las 72 horas tras la exposición bacteriana con un aislado de *S. aureus* en comparación con el efecto protector de inmunización con anticuerpos o bien neutralizantes o bien opsónicos solos. La combinación de los anticuerpos opsónicos y neutralizantes de toxina demostró un efecto protector en la prevención de una infección de piel y tejido blando y propagación a órganos. Sin embargo, el anticuerpo anti-toxina alfa neutralizante dado a conocer por esa solicitud de patente por sí mismo no es suficiente para prevenir la propagación a órganos/formación de abscesos o para neutralizar la infección.

Se realizó un intento adicional por Heveker *et al* (1994a, 1994b) que describieron anticuerpos monoclonales humanos y murinos neutralizantes dirigidos contra la toxina alfa de *S. aureus*. El anticuerpo monoclonal humano de subtipo IgG/lambda se caracteriza por la secuencia y muestra neutralización.

El hibridoma humano que produce anticuerpos anti-toxina alfa descrito por Heveker (1994a) se aisló usando leucocitos de sangre periférica de un voluntario sano inmunizado previamente con una vacuna de prueba de toxoide alfa de *S. aureus*. Aunque el toxoide alfa usado en el estudio de Heveker representa una toxina alfa químicamente modificada, podría suponerse que la modificación hace que los determinantes antigénicos sean menos inmunogénicos o incluso no inmunogénicos y como tal, el enfoque podría no producir inmunidad eficaz de manera equitativa, tal como se demostró para otras toxinas bacterianas, tales como la toxina colérica, en la que vacunas de toxoides estimularon anticuerpos anti-toxina que no conferían inmunidad frente a infecciones (Levine (1983)).

En la bibliografía se han identificado diversos factores como factores de virulencia críticos para la formación de abscesos, tales como toxinas, peptidoglicanos, factores extracelulares y enzimas. Un papel potencial de la toxina alfa en la formación de abscesos se postuló por Kapral *et al*. (1980). Se notifica que la toxina alfa se acumula considerablemente en el absceso tras la maduración de abscesos aunque no pudo demostrarse que la toxina alfa sea necesaria para la formación de abscesos. Una segunda publicación por Adlam *et al* (1977) anuló un papel clave en la formación de abscesos para las toxinas alfa. Los autores demostraron que la toxina alfa desempeña un papel clave en la extensión de una forma hemorrágica de mama azul de mastitis de conejo observada en brotes epidémicos naturales. Reprodujeron el cuadro clínico en el laboratorio con dos cepas de estafilococos no relacionadas. Un alto título de anti-toxina alfa circulante confirió protección contra esta forma letal de mastitis. Por tanto, el título neutralizante pudo prevenir un desenlace mortal modificando el cuadro clínico al estado de absceso menos grave. Sin embargo, la neutralización de toxina alfa no afecto a/previno la formación de abscesos en conejos. En una publicación más reciente, Kielian *et al* (2001) investigaron el papel de la toxina alfa en la formación de abscesos cerebrales en un modelo de ratón. De manera experimental, los autores implantaron cepas de *S. aureus* silvestres y mutantes de las mismas en el tejido cerebral del lóbulo frontal y evaluaron la capacidad de cada cepa para inducir abscesos cerebrales. Los autores usaron cepas mutantes en loci relevantes para la expresión de factores de virulencia conocidos, por ejemplo mutantes en el locus *sarA* y el locus *agr*, ambos implicados en la regulación global de factores de virulencia importantes. Puesto que la toxina alfa está bajo control del sistema regulador de sarA/agr, los autores también incluyeron una cepa mutante de toxina alfa en sus experimentos. Los datos experimentales demostraron que la replicación de cepas bacterianas mutantes para toxina alfa o el locus sarA/agr tenía una virulencia reducida tras una inyección de células bacterianas en el cráneo en comparación con su cepa control isogénica RN6390, dando como resultado un número de bacterias inferior y focos inflamatorios pequeños en los cerebros de los animales que se detectaban, en comparación con los grandes abscesos bien formados en los ratones que recibían la cepa isogénica. Sin embargo, las cepas mutantes no eran en su totalidad no virulentas en el modelo de abscesos cerebrales experimental y no puede excluirse que factor(es) adicional(es) además de la toxina alfa desempeñan papel(es) crítico(s) en la formación de abscesos cerebrales.

El papel de la toxina alfa en la formación de abscesos se evaluó en otro entorno experimental tal como se explica resumidamente por Schwan *et al* (2003) en un análisis de modelos de infección por *S. aureus* local, sistémica y de formación de abscesos. Los autores observaron que las cepas de *S. aureus* no hemolíticas se volvieron más abundantes a medida que pasaba el tiempo en modelos heridas y abscesos murinos, pero no dentro de tejidos de órganos asociados con infecciones sistémicas. Por ejemplo, en una infección mixta que usa todas las variantes de la cepa de *S. aureus* RN6390 (hiperhemolítica, hemolítica y no hemolítica) en el modelo de abscesos, el grupo hiperhemolítico disminuyó notablemente en el día 7 después de la infección, mientras que la población no hemolítica aumentó significativamente. La secuenciación de varios de los mutantes marcados de manera distintiva indicó mutaciones en el gen agrC o dentro de la región intergénica agrA-agrC, lo que dio como resultado la reducción de la actividad tanto de toxina alfa como de toxina delta. En el análisis de cepas mutantes específicas para la actividad de agr (agr-) y toxina alfa (hla-) en modelos de infección de abscesos, heridas y sistémica, ni la cepa mutante agr- ni la cepa mutante hla- mostraron ninguna diferencia en recuentos bacterianos en abscesos murinos en el día 4 en comparación con las cepas silvestres originales (RN6390). Lo mismo se aplicaba para infecciones locales (modelo de heridas), mientras que se produjo un aclarado considerable de la cepa mutante para hla y la cepa mutante para agr en el modelo de infección sistémica. El resultado indicó claramente la importancia de la toxina alfa en infecciones sistémicas pero no en infecciones locales o formación de abscesos. De hecho, infecciones mixtas con las cepas mutante hla- y silvestre en el modelo de abscesos mostraron una ligera ventaja dada a la población mutante para hla con respecto a la cepa silvestre. Los autores incluso concluyeron que las mutaciones de agr provocan reducciones en la expresión de las toxinas alfa y delta, lo que a su vez contribuyó a una ventaja de crecimiento de este grupo mutante para agr dentro de una población mixta de células de *S. aureus* que residen en abscesos y heridas. Los resultados contradicen aparentemente los resultados descritos por Kielian *et al*, en los que la falta de producción de toxina alfa reducía la virulencia bacteriana. Por tanto, el papel de la toxina alfa en la formación de abscesos no es claro.

En general, no existe evidencia que señale a un sólo factor de virulencia como el principal impulsor en la formación de abscesos. Como tal, la investigación se centró en la presencia de factores adicionales no controlados en su totalidad por *S. aureus*, tales como factores del entorno, o motivos estructurales dados como el factor clave común en la formación de abscesos. Por ejemplo, los datos más recientes en cuanto a factores de virulencia que afectan a la formación de abscesos señalan a los efectos de iones metálicos bivalentes no quelados, tales como Mn^{++} y Ca^{++} en la formación de abscesos y el crecimiento bacteriano dentro de abscesos. La quelación de iones metálicos en animales inhibió la formación de abscesos hepáticos e inhibió el crecimiento de *S. aureus* en abscesos (Corbin 2008). Por otro lado Tzianabos *et al*. (2001) supuso que un microorganismo tal como *S. aureus* requiere factores de virulencia presentes en la célula bacteriana con el fin de establecer estructuras patológicas tales como abscesos en tejido. Demostraron que cepas altamente asociadas con casos clínicos de abscesos pueden tener uno o más polisacáridos asociados a la pared celular con un motivo de carga zwitteriónica (un compuesto químico que porta una carga neta total de 0, por tanto eléctricamente neutro pero que porta cargas positivas y negativas formales en diferentes átomos). En ausencia del motivo de carga zwitteriónica no se pudo observar ninguna formación de abscesos. Los autores concluyeron que estos polímeros de polisacárido pueden modular la inducción de abscesos por este microorganismo. Además presentaron datos de confirmación no sólo para los polisacáridos de núcleo CP5 y CP8 sino también para el ácido lipoteicoico (LTA), un factor de virulencia adicional bien caracterizado dentro de la

pared celular. También identificaron un motivo de carga zwitteriónica dentro del LTA y por tanto generalizaron su hipótesis para la formación de abscesos a la presencia de un motivo de carga zwitteriónica en cualquier factor de virulencia fundamental para la formación de abscesos.

Basándose en los resultados que indican que diversos factores contribuyen a la formación de abscesos mediada por *S. aureus*, un experto en la técnica no podría esperar que la neutralización de un sólo factor prevenga la formación de abscesos.

Por tanto, un objeto de la invención es la provisión de medios y métodos para profilaxis y terapia de infección por *S. aureus* clínicamente compleja, tal como formación de abscesos.

Por consiguiente, un problema técnico subyacente de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal específico para la toxina alfa derivada de *S. aureus*, en el que el anticuerpo tiene una capacidad protectora *in vivo*, contra la infección por *S. aureus* clínicamente compleja, tal como formación de abscesos.

El problema técnico se resuelve mediante los anticuerpos monoclonales tal como se define a continuación.

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal denominado 243-4 específico para la toxina alfa de *S. aureus*, en el que la región variable de la cadena ligera del anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 1 en la región CDR1, la SEQ ID NO: 2 en la región CDR2 y la SEQ ID NO: 3 en la región CDR3, y en el que la región variable de la cadena pesada del anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 4 en la región CDR1, la SEQ ID NO: 5 en la región CDR2 y la SEQ ID NO: 6 en la región CDR3, o un fragmento del mismo que puede unirse a la toxina alfa del *S. aureus*, en el que el fragmento es un fragmento Fab o $F(ab')_2$ o una mezcla de los mismos.

Según una realización preferida de la presente invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal humano, específico para la toxina alfa de *S. aureus*, en el que la región variable de la cadena ligera del anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 1 en la región CDR1, la SEQ ID NO: 2 en la región CDR2 y la SEQ ID NO: 3 en la región CDR3, y en el que la región variable de la cadena pesada del anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 4 en la región CDR1, la SEQ ID NO: 5 en la región CDR2 y la SEQ ID NO: 6 en la región CDR3; o un fragmento del mismo que puede unirse a la toxina alfa del *S. aureus*, en el que el fragmento es un fragmento Fab o $F(ab')_2$ o una mezcla de los mismos.

Sorprendentemente, se ha encontrado que los anticuerpos monoclonales según la invención presentan alta capacidad protectora contra la formación de abscesos. Se ha mostrado la prevención de formación de abscesos en un modelo de riñón de ratón mediante la administración de un anticuerpo monoclonal humano específico para la toxina alfa según la invención. Basándose en la naturaleza de la toxina, que es concretamente una proteína secretada en vez de un componente asociado a la pared celular (polisacárido), puede excluirse cualquier efecto bactericida directo, por ejemplo destrucción de la célula bacteriana, o función efectora indirecta relacionada con el sistema inmunitario, tal como opsonofagocitosis mediada por complemento, y no explica la falta de formación de abscesos.

El término “anticuerpo monoclonal” tal como se usa en el presente documento abarca cualquier anticuerpo monoclonal parcial o completamente humano independientemente de la fuente de la que se obtiene el anticuerpo monoclonal. Se prefiere un anticuerpo monoclonal completamente humano. Se prefiere la producción del anticuerpo monoclonal por un hibridoma. El hibridoma puede ser un hibridoma de mamífero, tal como murino, de res o de ser humano. Un hibridoma preferido es de origen humano. El anticuerpo monoclonal también puede obtenerse mediante ingeniería genética y en particular mediante injerto de CDR de los segmentos de CDR tal como se define en las reivindicaciones, en anticuerpos monoclonales disponibles reemplazando las regiones CDR del anticuerpo de origen por los segmentos de CDR específicos tal como se define en las reivindicaciones.

El término “región CDR” significa la región determinante de complementariedad de un anticuerpo, es decir la región que determina la especificidad de un anticuerpo por un antígeno particular. Tres regiones CDR (CDR1 a CDR3) en la cadena tanto ligera como pesada son responsables de la unión al antígeno.

Las posiciones de las regiones CDR dentro de la cadena pesada son tal como sigue:

Aminoácidos 26 a 33 de la región CDR1 dentro del exón V_H,

Aminoácidos 51 a 58 de la región CDR2 dentro del exón V_H,

Aminoácidos 97 a 110 de la región CDR3 dentro del exón V_H.

Las posiciones de las regiones CDR son independientes de la clase de anticuerpo, es decir IgM, IgA o IgG.

Las posiciones de la región CDR dentro de la cadena ligera de tipo lambda son tal como sigue:

Aminoácidos 26 a 33 de la región CDR1 dentro del exón $V\lambda$,

Aminoácidos 51 a 53 de la región CDR2 dentro del exón $V\lambda$,

Aminoácidos 90 a 101 de la región CDR3 dentro del exón Vλ.

Pueden obtenerse alineaciones de aminoácidos de los exones V_H, Vχ y Vλ a partir de la base de datos V Base (http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/share/textes/).

El término “fragmento” significa cualquier fragmento del anticuerpo que puede unirse a la toxina alfa de *S. aureus*. El fragmento tiene una longitud de al menos 10, preferiblemente 20, más preferiblemente 50 aminoácidos. Se prefiere además que el fragmento comprenda la región de unión del anticuerpo. Se prefiere que el fragmento sea Fab, $F(ab')_2$, anticuerpo de cadena sencilla o de un sólo dominio. El más preferido es un fragmento Fab o $F(ab')_2$ o una mezcla del mismo. Los fragmentos de anticuerpo pueden estar glicosilados, conteniendo por ejemplo restos de hidratos de carbono en las regiones variables del anticuerpo.

Por consiguiente, la presente invención proporciona además un anticuerpo monoclonal tal como se define en el presente documento, en el que el anticuerpo es un fragmento Fab o $F(ab')_2$.

El término “muteína” abarca cualquier muteína del anticuerpo monoclonal que difiere por la adición, deleción y/o sustitución de al menos un aminoácido. Preferiblemente, la muteína del anticuerpo monoclonal porta al menos una sustitución conservativa en cualquiera de las CDR en la cadena pesada y/o cadena ligera tal como se indica en las reivindicaciones. Más preferiblemente, la muteína tiene no más de 5, no más de 4, preferiblemente no más de 3, de manera particularmente preferida no más de 2 sustituciones conservativas. La capacidad del fragmento o muteína del anticuerpo para poder unirse a la toxina alfa de *S. aureus* se determina mediante ELISA directo tal como se describe en la sección de ejemplos: la toxina alfa purificada se inmoviliza en la fase sólida de placas de ELISA. Se incuban fragmentos de anticuerpo o muteínas de los anticuerpos con la toxina alfa inmovilizada, y se visualizan anticuerpos o muteínas de los mismos unidos, mediante un anticuerpo secundario adecuado conjugado con enzima.

El término “sustitución conservativa” significa un reemplazo de un aminoácido que pertenece a un grupo fisicoquímico particular por un aminoácido que pertenece al mismo grupo físico-químico. Los grupos físico-químicos se definen tal como sigue:

El grupo físico-químico de aminoácidos no polares comprende: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina y triptófano. El grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales polares no cargadas comprende asparagina, glutamina, tirosina, cisteína y cistina. El grupo físico-químico de aminoácidos que tienen una cadena lateral polar cargada positivamente comprende lisina, arginina e histidina. El grupo físico-químico de aminoácidos que tienen una cadena lateral polar cargada negativamente comprende ácido aspártico y ácido glutámico, denominándose sus aniones de carboxilato también aspartato y glutamato.

Según una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal específico para la toxina alfa de *S. aureus*, en el que la región variable de la cadena ligera del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y la región variable de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, o un fragmento de los mismos que puede unirse a la toxina alfa de *S. aureus*, en el que el fragmento es un fragmento Fab o $F(ab')_2$ o una mezcla de los mismos.

El término “variante” tal como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido, en el que la secuencia de aminoácidos presenta un determinado grado de identidad con la secuencia de aminoácidos tal como se expone en la lista de secuencias.

El término “% de identidad” conocido por el experto en la técnica indica el grado de relación entre dos o más moléculas de polipéptido, que se determina mediante la coincidencia entre las secuencias. El porcentaje de “identidad” se encuentra a partir del porcentaje de regiones idénticas en dos o más secuencias, teniendo en cuenta huecos u otras características de secuencia.

El porcentaje de identidad de polipéptidos mutuamente relacionados puede determinarse por medio de procedimientos conocidos. Por lo general, se usan programas informáticos especiales con algoritmos que tienen en cuenta los requisitos especiales. Los procedimientos preferidos para la determinación de la identidad generan en primer lugar la mayor coincidencia entre las secuencias estudiadas. Los programas informáticos para la determinación de la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas GCG, incluyendo GAP (Devereux J *et al*., (1984); Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison (WI)); BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul S *et al*., (1990)). El programa BLAST X puede obtenerse del Centro Nacional para la Información sobre Biotecnología (National Centre for Biotechnology Information, NCBI) y de otras fuentes (manual de BLAST, Altschul S *et al*., NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul S *et al*., 1990). También puede usarse el bien conocido algoritmo de Smith Waterman para la determinación del porcentaje de identidad.

Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias incluyen los siguientes:

Algoritmo:	Needleman S. B. y Wunsch, C.D. (1970)
Matriz de comparación:	BLOSUM62 de Henikoff S. y Henikoff J.G. (1992)
Penalización por hueco:	12
Penalización por longitud de hueco:	2

El programa GAP también es adecuado para su uso con los parámetros anteriores. Los parámetros anteriores son los parámetros convencionales (parámetros por defecto) para comparaciones de secuencias de aminoácidos, en los que los huecos en los extremos no disminuyen el valor de identidad. Con secuencias muy pequeñas en comparación con la secuencia de referencia, puede además ser necesario aumentar el valor esperado hasta 100.000 y en algunos casos reducir la longitud de palabra (tamaño de palabra) hasta 2.

Pueden usarse algoritmos modelos adicionales, penalizaciones por apertura de hueco, penalizaciones por extensión de hueco y matrices de comparación incluyendo las mencionadas en el manual de programa, paquete Wisconsin, versión 9, setiembre de 1997. La elección dependerá de la comparación que va a realizarse y además de si la comparación se realiza entre pares de secuencias, en la que se prefieren GAP o Best Fit, o entre una secuencia y una gran base de datos de secuencias, en la que se prefieren FASTA o BLAST. Una coincidencia del 85% determinada con los algoritmos mencionados anteriormente se describe como una identidad del 85%. Lo mismo se aplica para grados de identidad superiores.

Las variantes pueden tener una identidad del 85% o más, preferiblemente del 90% o más, y más preferiblemente del 95% o más.

Según una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humano. El término “humano” tal como se usa en el presente documento significa que el anticuerpo monoclonal humano está sustancialmente libre de secuencias de aminoácidos de especies extrañas, preferiblemente el anticuerpo monoclonal humano consiste en su totalidad en una secuencia de aminoácidos humanos.

La cadena ligera del anticuerpo monoclonal según la presente invención puede ser del tipo kappa o lambda.

En una realización preferida de la invención, la cadena ligera es del tipo lambda. La cadena ligera puede ser o bien una cadena que se produce de manera natural incluyendo un tipo obtenido mediante transposición de manera natural, uno modificado genéticamente o bien uno sintético de cadena ligera.

La cadena pesada del anticuerpo monoclonal de la presente invención puede seleccionarse de los isotipos IgM, IgA o IgG, preferiblemente IgG.

Según una realización preferida adicional de la invención, la cadena pesada del anticuerpo monoclonal es del tipo IgG.

El término “que puede unirse” tal como se usa en el presente documento se refiere a la unión que se produce entre un anticuerpo y su antígeno reconocido frente al que se produjo el anticuerpo. Este tipo de unión es una unión específica en contraposición con una no específica que se produce en ausencia del antígeno.

Se preparan anticuerpos que pueden unirse a la toxina alfa usando una tecnología de hibridoma, en la que la célula B es una célula B de mamífero, tal como murina, de res o de ser humano. Preferiblemente, la célula B es una célula B humana. Alternativamente, el anticuerpo monoclonal que puede unirse a la toxina alfa puede obtenerse injertando CDR de las regiones CDR tal como se indica en las reivindicaciones, en anticuerpos monoclonales disponibles produciendo de ese modo un anticuerpo monoclonal específico para la toxina alfa de *S. aureus* según la presente invención.

En una realización adicional de la invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal que puede unirse a la toxina alfa de *S. aureus*, que puede obtenerse a partir de una célula B de mamífero, tal como murina, de res o de ser humano, preferiblemente una célula B humana o un hibridoma obtenido mediante la fusión de dicha célula B humana con una célula de mieloma o heteromieloma.

En una realización adicional, la invención proporciona un hibridoma que puede producir el anticuerpo monoclonal que puede unirse a la toxina alfa de *S. aureus* tal como se define en el presente documento.

El término “toxina alfa” tal como se usa en el presente documento se refiere a una proteína bacteriana producida por *S. aureus*. La toxina alfa se somete a oligomerización en el interior de un pre-poro heptamérico tras la unión a la superficie celular de la célula huésped. La formación del poro es una causa predominante de apoptosis y lisis celular. Por tanto, la capacidad del anticuerpo monoclonal para unirse a las formas tanto monomérica como oligomérica de la toxina alfa derivada de *S. aureus* es de importancia fundamental para una protección potente.

Según una realización preferida adicional de la invención, el anticuerpo monoclonal de la invención puede unirse específicamente a las formas monomérica y oligomérica de la toxina alfa de *S. aureus*. Según una realización adicional de la invención, el anticuerpo monoclonal de la invención o fragmento o muteína del mismo puede unirse específicamente a las formas o bien monomérica o bien oligomérica de la toxina alfa de *S. aureus* o a ambas.

El término “forma oligomérica” tal como se usa en el presente documento incluye una forma distinta de la forma monomérica de la toxina alfa, tal como formas dimérica, trimérica, tetramérica, pentamérica, hexamérica, heptamérica, etc., o poliméricas, tal como la forma del pre-poro heptamérico de la toxina alfa.

Según una realización preferida adicional, el anticuerpo monoclonal de la invención está modificado en el extremo

N-terminal, internamente o en el extremo C-terminal. Las modificaciones incluyen la di-, oligo- o polimerización de la forma monomérica por ejemplo mediante reticulación usando diciclohexilcarbodiimida. Los di-, oligo- o polímeros así producidos pueden separarse unos de otros mediante filtración en gel. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones de cadena lateral, por ejemplo modificaciones de residuos de ε-amino-lisina, o modificaciones amino y carboxilo terminales, respectivamente. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones postraduccionales, por ejemplo glicosilación y/o desglicosilación parcial o completa de la proteína, y formación de enlaces disulfuro. El anticuerpo también puede estar conjugado con un marcador, tal como un marcador enzimático, fluorescente o radiactivo. Preferiblemente, la modificación se selecciona de al menos una de oligomerización, glicosilación o conjugación con un fármaco o un marcador.

Además, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican para la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente, del anticuerpo monoclonal de la presente invención. El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico que se produce de manera natural o bien derivado de la línea germinal o bien de transposición que se produce en células B, alternativamente los ácidos nucleicos pueden ser sintéticos. Los ácidos nucleicos sintéticos también incluyen ácidos nucleicos que tienen enlaces internucleosídicos modificados incluyendo fosfotioéster para aumentar la resistencia de los ácidos nucleicos frente a la degradación. El ácido nucleico puede modificarse mediante ingeniería genética o producirse completamente de manera sintética mediante síntesis de nucleótidos.

La presente invención proporciona además vectores que comprenden al menos un ácido nucleico que codifica para la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de la presente invención y/o al menos un ácido nucleico que codifica para la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de la presente invención. Los ácidos nucleicos pueden estar o bien presentes en el mismo vector o bien pueden estar presentes en forma de vectores binarios. El vector comprende preferiblemente el promotor ligado operativamente al ácido nucleico con el fin de facilitar la expresión del ácido nucleico que codifica para la cadena ligera y/o pesada. Preferiblemente, el vector también incluye un origen para la replicación y el mantenimiento en una célula huésped. El vector también puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia señal ubicada en el sentido de 5’ del ácido nucleico que codifica para la cadena ligera o la cadena pesada. La secuencia señal puede facilitar la secreción de la cadena codificada al medio.

Preferiblemente, el vector se deriva de los adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, virus SV 40, retrovirus, virus de plantas o bacteriófagos tales como derivados de lambda o M13. El vector particularmente preferido es un vector que contiene las regiones constantes de cadenas pesadas de la Ig humana y cadenas ligeras humanas, tal como el sistema de vectores integrados para la expresión eucariota de inmunoglobulinas descrito por Persic *et al*., 1987.

Además, la presente invención proporciona células huésped que comprenden el vector y/o el ácido nucleico adecuados para la expresión del vector. En la técnica se conocen numerosos sistemas de expresión procariotas y eucariotas en los que se prefieren células huésped eucariotas tales como células de levadura, células de insecto, células de planta y células de mamífero, tales como células HEK293, células PerC6, células CHO, células COS o células HELA y derivados de las mismas. Se prefieren particularmente líneas celulares de producción humanas. Se prefiere que las células huésped transfectadas secreten el anticuerpo producido al medio de cultivo. Si se consigue la expresión intracelular, entonces se realiza la renaturalización según procedimientos convencionales tales como por ejemplo los descritos por Benetti *et al*., 1998.

Los anticuerpos monoclonales humanos según la invención se generan a partir de linfocitos sanguíneos de un paciente convaleciente y por tanto dan como resultado anticuerpos seleccionados y mejorados de manera natural con alta afinidad para la neutralización y protección eficaz contra infecciones.

La presente invención también proporciona métodos para producir el anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo monoclonal se produce cultivando el hibridoma descrito anteriormente. El anticuerpo monoclonal producido se secreta al sobrenadante y puede purificarse de éste aplicando técnicas cromatográficas convencionales.

Alternativamente, el anticuerpo monoclonal se produce por la célula huésped que comprende un vector según la presente invención y cultivando la célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión recombinante de la cadena de anticuerpo codificada. Preferiblemente, la célula huésped comprende al menos un ácido nucleico que codifica para la cadena ligera y al menos un ácido nucleico que codifica para la cadena pesada y puede ensamblar el anticuerpo monoclonal de manera que se genera una estructura tridimensional que es equivalente a la estructura tridimensional de un anticuerpo monoclonal producido por un mamífero, preferiblemente por una célula B humana. Si la cadena ligera se produce por separado de la cadena pesada, entonces ambas cadenas pueden purificarse y ensamblarse posteriormente para producir un anticuerpo monoclonal que tiene esencialmente la estructura tridimensional de un anticuerpo monoclonal tal como se produce por un mamífero, preferiblemente por una célula B humana.

El anticuerpo monoclonal también puede obtenerse mediante la expresión recombinante de la cadena ligera y/o pesada codificada en la que el ácido nucleico se produce mediante el aislamiento de un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo monoclonal de una manera conocida y el injerto de la secuencia de ácido nucleico que codifica para las CDR tal como se define en las reivindicaciones, en el ácido nucleico aislado.

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo monoclonal y/o los ácidos nucleicos que codifican para una cadena ligera y/o pesada del anticuerpo monoclonal.

La composición farmacéutica puede comprender además fármacos antibióticos tales como estreptomicina, penicilina y vancomicina, etc., acoplados preferiblemente al anticuerpo monoclonal de la invención.

Las composiciones farmacéuticas comprenden el anticuerpo monoclonal en un intervalo de dosificación de 0,1-100 mg/kg de peso corporal.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de cualquier manera conocida tal como administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, tópica, intranasal o como pulverización para inhalación.

En una realización preferida de la invención, las composiciones farmacéuticas se usan para la profilaxis o el tratamiento de la formación de abscesos en un órgano de un paciente mamífero, tal como reses, cerdos, gatos, perros, caballos, seres humanos. En una realización preferida de la invención, las composiciones farmacéuticas se aplican a pacientes humanos. En una realización adicional de la invención, la formación de abscesos está provocada por una infección por *S. aureus*. Además, la infección por *S. aureus* que va a tratarse con la composición farmacéutica de la invención puede ser por ejemplo una infección de la mama, tal como mastitis.

Por consiguiente, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo monoclonal o los ácidos nucleicos que codifican para la región variable de la cadena ligera y/o la cadena pesada tal como se define en el presente documento, para la preparación de una composición farmacéutica para la profilaxis o el tratamiento de una formación de abscesos en un órgano en un mamífero, preferiblemente un paciente humano.

En una realización preferida de la invención, las composiciones farmacéuticas, el anticuerpo monoclonal o los ácidos nucleicos que codifican para la región variable de la cadena ligera o la cadena pesada tal como se define en el presente documento se aplican para la profilaxis o el tratamiento de una formación de abscesos en un órgano, tal como riñón, corazón, hígado, vesícula biliar, páncreas, intestino delgado, intestino grueso, pulmón, cerebro, piel, ojo, tejido linfático o bazo. En una realización preferida de la invención, el absceso que va a tratarse es un absceso abdominal. Por consiguiente, el órgano abdominal que va a tratarse es hígado, vesícula biliar, bazo, páncreas, intestino delgado, riñones e intestino grueso.

El término “formación de abscesos” tal como se usa en el presente documento se refiere a la formación de un absceso en un órgano, tal como riñón, corazón, hígado, vesícula biliar, páncreas, intestino delgado, intestino grueso, pulmón, cerebro, piel, ojo, tejido linfático o bazo. El término “absceso” tal como se usa en el presente documento significa un depósito de pus que se ha acumulado en una cavidad formada por el tejido a base de un proceso infeccioso (habitualmente provocado por bacterias o parásitos). Las toxinas liberadas por estas bacterias que se multiplican destruyen células y desencadenan una respuesta inflamatoria, que atrae grandes números de glóbulos blancos a la zona y aumenta el flujo sanguíneo en la región. Estos leucocitos descomponen los tejidos muertos y absorben las bacterias por medio de fagocitosis. Se forma pus espesa verde o amarillenta a partir de los tejidos descompuestos, las bacterias muertas y los leucocitos, y el líquido extracelular que se ha acumulado. Un absceso se caracteriza por la encapsulación por una pared del absceso que se forma por las células sanas adyacentes en un intento de que el pus no infecte estructuras vecinas. Es una reacción defensiva del tejido para prevenir la extensión de materiales infecciosos a otras partes del organismo. Pueden producirse abscesos en cualquier clase de tejido sólido pero lo más frecuentemente sobre la superficie de la piel (en la que pueden ser pústulas superficiales (furúnculos) o abscesos profundos en la piel), en los pulmones, cerebro, riñones y amígdalas. Complicaciones principales son la extensión del material del absceso, tal como propagación a órganos hacia tejidos adyacentes o lejanos y necrosis extensa en la región (gangrena). La formación de abscesos se detecta evaluando la carga bacteriana dentro del órgano.

El término “absceso abdominal” tal como se usa en el presente documento se refiere a un absceso en un órgano de la cavidad abdominal. La cavidad abdominal es la cavidad del organismo que contiene la mayor parte de las vísceras y que se ubica por debajo de (o inferior a) la cavidad torácica, y por encima de la cavidad pélvica. Es una parte de la cavidad abdominopélvica. Los órganos de la cavidad abdominal incluyen el estómago, hígado, vesícula biliar, bazo, páncreas, intestino delgado, riñones e intestino grueso.

“Propagación a órganos” tal como se usa en el presente documento significa la diseminación de bacterias vivas desde el sitio local de infección a tejidos y órganos distantes. La propagación a órganos se caracteriza por la presencia de células bacterianas vivas infectantes en tejido sano sin formación de colonias macroscópicas encapsuladas de células bacterianas.

“Carga bacteriana” tal como se usa en el presente documento se define como la cantidad de células bacterianas vivas dentro de un tejido anatómico bien definido expresada como la cantidad de células bacterianas que crecen hasta formar colonias en medios de crecimiento sólidos, tales como placas de agar. Para el fin de evaluar la carga bacteriana dentro de un órgano, el órgano se extrae quirúrgicamente del tejido circundante y el tejido del órgano se analiza con tamiz en condiciones estériles en solución salina estéril para destruir la organización bien estructurada del tejido y para separar las células bacterianas del tejido de mamífero. Se extiende una cantidad definida de

suspensión celular (o diluciones en serie de la misma en solución salina estéril) en medios de crecimiento bacteriano sólidos. La carga bacteriana se expresa como “unidades formadoras de colonias” por riñón (por ejemplo ufc/riñón).

La presente invención también proporciona un kit de prueba para el diagnóstico de infecciones por *S. aureus* que comprende al menos un anticuerpo monoclonal de la presente invención y opcionalmente componentes adecuados adicionales para llevar a cabo una prueba de diagnóstico.

Componentes adecuados para llevar a cabo una prueba de diagnóstico son por ejemplo una disolución tampón con una osmolalidad dentro de un intervalo de 280-320 mOsm/litro y un valor de pH dentro de un intervalo de pH 6-8; una disolución tampón que contiene agentes quelantes; una disolución tampón que contiene cationes monovalentes o bivalentes con la concentración de cationes totales de la composición tampón que oscila entre aproximadamente 0,02 M y aproximadamente 2,0 M; y/o una disolución tampón que contiene suero derivado de animal o de ser humano a una concentración entre el 0,01% y el 20%.

El kit de prueba es adecuado para el diagnóstico fiable específico de una infección por *S. aureus*. Un ensayo de prueba puede basarse en una prueba de ELISA convencional en forma líquida o unida a membrana. La detección puede ser directa o indirecta tal como se conoce en la técnica en la que el anticuerpo se conjuga opcionalmente con un marcador enzimático, fluorescente o radioactivo.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

La figura 1 muestra la secuencia de ADN y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 243-4. La región CDR1 de 243-4 está en las posiciones 26 a 33, la región CDR2 de 243-4 está en las posiciones 51 a 58 y la región CDR3 de 243-4 está en las posiciones 97 a 110.

Figura 2

La figura 2 muestra la secuencia de ADN y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 243-4. La región CDR1 de 243-4 está en las posiciones 26 a 33, la región CDR2 de 243-4 está en las posiciones 51 a 53 y la región CDR3 de 243-4 está en las posiciones 90 a 101.

Figura 3

La figura 3 muestra la especificidad de antígeno del anticuerpo monoclonal humano 243-4. Se evaluó la especificidad de antígeno del anticuerpo 243-4 mediante la unión a un panel de toxinas bacterianas en un ensayo de ELISA. Se realizó un ELISA en placas de microtitulación recubiertas con toxinas purificadas. Tras la incubación durante la noche a temperatura ambiente se bloquearon las placas de microtitulación con BSA y se detectó la unión del AcM 243-4 a toxinas inmovilizadas con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana conjugado con HRP. La unión del anticuerpo monoclonal humano 243-4 a la toxina alfa de *S. aureus* está favorecida claramente con respecto a la unión al resto de las toxinas sometidas a prueba.

Figura 4

La figura 4 muestra la unión del anticuerpo monoclonal humano 243-4 a la toxina alfa de cepas epidémicas de *S. aureus* en experimentos de inmunotransferencia. Se monitorizó la producción de toxina alfa de doce cepas epidémicas de *S. aureus* de cultivos bacterianos en fase de crecimiento estacionario. Tras el cultivo, se cargaron sobrenadantes bacterianos normalizados y toxina alfa purificada en un gel de SDS-PAGE y se aplicaron a electrotransferencia. Tras el bloqueo, se incubó la membrana de nitrocelulosa con anticuerpo monoclonal humano 243-4 purificado. Se demostró la producción y reconocimiento de la toxina alfa tanto monomérica como/o heptamérica de cada cepa epidémica evaluada mediante la unión del anticuerpo monoclonal humano 243-4.

En la figura 4, M significa marcador de tamaño, los números 1-12 son cepas epidémicas de *S. aureus* y αTox es una toxina alfa purificada.

Figura 5

La figura 5 muestra la determinación de la afinidad del anticuerpo monoclonal humano 243-4 mediante BIAcore. Se analizó la cinética de unión del anticuerpo monoclonal humano 243-4 usando un instrumento BIAcore 2000. Se aplicaron diferentes concentraciones de toxina alfa a una célula de flujo inmovilizada con el AcM 243-4. Se registraron las fases de asociación y disociación para calcular la constante de disociación del anticuerpo. Se evaluaron los datos cinéticos mediante ajuste global usando el software BIAevaluation 4.1.

Figura 6

La figura 6 muestra la neutralización de la toxina alfa por el anticuerpo monoclonal humano 243-4 en un modelo de cultivo tisular de lesión celular alveolar humana. Se cocultivaron células epiteliales alveolares A549 humanas durante 16 h con toxina alfa en presencia de o bien anticuerpo control de isotipo o bien anticuerpo monoclonal

243-4. Tras ese tiempo, se analizaron las células mediante el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH), que proporciona una lectura de la lesión celular provocada por la toxina alfa y revela el grado de protección que puede conseguirse con los anticuerpos aplicados. Para la interpretación de los resultados, se fijó el grado de lisis celular, que estaba resultando de la preincubación con la concentración de toxina alfa más alta, al 100%. Las células tratadas con toxina sólo mostraron una titulación de lisis dependiendo de la concentración de toxina alfa aplicada. Se observó la misma titulación cuando se preincubó la toxina alfa con el anticuerpo control de isotipo, que no indicó ningún efecto protector del control de isotipo. En contraposición, se protegieron células epiteliales alveolares humanas frente a la lisis dependiente de toxina alfa mediante incubación con el anticuerpo monoclonal humano 243-4. Se realizó el experimento en tres ocasiones independientes, confirmando cada una de ellas la capacidad de protección del anticuerpo 243-4.

Figura 7

La figura 7 muestra el efecto protector del anticuerpo monoclonal humano 243-4 en un modelo de ratón relacionado con catéter venoso central de infección multiorgánica. Veinticuatro horas tras la colocación del catéter, los ratones recibieron 1 x 10e7 UFC de la cepa de *S. aureus* US300 y o bien 7,5 mg/kg de AcM 243-4 o bien PBS a través del catéter. Dos días después, los ratones del grupo con tratamiento recibieron una segunda dosis de anticuerpo (5 mg/kg), mientras que los ratones del grupo control sólo recibieron PBS. Cinco días tras la intervención quirúrgica se sacrificaron los ratones para monitorizar la carga bacteriana en el riñón y la formación de abscesos en el riñón. Los ratones inmunizados con el anticuerpo monoclonal 243-4 mostraron una reducción considerable de la carga bacteriana y no se observó ninguna formación de abscesos en el riñón, mientras que todos los ratones control tenían una alta carga bacteriana en el riñón y una formación de abscesos considerable.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención pero no se pretende que limiten el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Secuencias de ADN y aminoácidos de 243-4

Se determina la especificidad del anticuerpo mediante la secuencia de ADN y aminoácidos, respectivamente. Se determinaron secuencias de ADN de los fragmentos variables de las cadenas pesada y ligera.

Para el aislamiento de ARN se sedimentaron 5 x 10e5 células de hibridoma mediante centrifugación y se homogeneizaron usando columnas Qiashredder (n.º 79654, Qiagen). Entonces se aisló el ARNm de los sedimentos de células de hibridoma homogeneizados usando el kit RNeasy (n.º 74124, Qiagen) según el manual de instrucciones del proveedor. Basándose en el ARNm aislado, se sintetizó ADNc mediante transcripción inversa usando transcriptasa inversa Superscript II (n.º 18064-022, Invitrogen). Se amplificaron los genes del anticuerpo 243-4 a partir del ADNc sintetizado usando el kit de PCR Advantage 2 (n.º 639206, Clontech) según el manual de instrucciones del proveedor. Se garantizó una amplificación específica de genes de anticuerpo mediante la aplicación de combinaciones de cebadores diseñados para la amplificación de genes de región variable de IgG transpuestos humanos (Welschof *et al*., 1995). Para la amplificación tanto de los dominios de cadena pesada variables (VH) como de los dominios de cadena ligera variables (VL) se usó un conjunto de cebadores directos específicos de cadena en combinación con un cebador inverso que hibrida específicamente en los dominios constantes de o bien la cadena pesada o bien la cadena ligera (CH de IgG de amplificación de VH en combinación con VH1, VH2 y VH3; CL λ de amplificación de VL en combinación con VLλ 1 , VLλ 2/5, VLλ 3, VLλ 4a, VLλ 4b y VLλ 6; véase la tabla 1). Entonces se clonaron productos de amplificación de PCR en el plásmido pCR4-TOPO del kit de clonación TOPO TA para secuenciación (n.º K457540, Invitrogen) y se envió finalmente ADN de plásmido purificado para secuenciación (Microsynth, Balgach, Suiza) usando los cebadores específicos de plásmido del kit de clonación TOPO (T3 y T7, véase la tabla 1). Se procesaron las secuencias de ADN obtenidas y se alinearon usando el paquete de software Clone Manager (n.º 875-501-1787, Scientific&Educational Software). Se definió una secuencia consenso que resultó de las alineaciones realizadas y se analizó posteriormente usando la base de datos V Base de todas las secuencias de región variable de línea germinal humana (http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/share/textes/). Basándose en los resultados de secuenciación inicial se diseñaron secuencias de cebador interno específico para cadena adicionales (VL-atox as y VH-atox as, véase la tabla 1) y se aplicaron con el fin de confirmar la secuencia de anticuerpo identificada en las regiones de hibridación de las combinaciones de cebadores que se usaron anteriormente. Se aplicaron los genes de anticuerpo generados de ese modo a secuenciación tal como se describió anteriormente, tal como se muestra en las figuras 1 y 2.

Tabla 1

Secuencias de cebador usadas para amplificación y secuenciación de dominios variables del anticuerpo 243-4

Cebador	Fuente	SEQ ID NO	Secuencia (de 5' a 3')	Aplicación
CH de IgG	Welschof *et al*., J Immunol Met, 179, 1995	9	GAC C(G^{50})GA TGG GCC CTT GGT GGA*	PCR, secuenciación
VH1		10	C(G^{50})AG GTG CAG CTG GTG CAG TCT*	PCR, secuenciación
VH2		11	CAG GTG(A^{50}) CAG CTG CAG G(C^{50})AG TC*	PCR, secuenciación
VH3		12	GAG GTG CAG CTG G(T^{50})TG GAG TCT*	PCR, secuenciación
CLλ		13	AGA GGA G(C^{50})GG GAA CAG AGT GAC*	PCR, secuenciación
VLλ 1		14	CAG TCT GTG T(C^{50})TG ACG(T^{50}) CAG CCG CCC TCA*	PCR, secuenciación
VLλ 2/5		15	CAG TCT GCG CTG ACT CAA(G^{50}) CCG G(C^{50})CC TCT*	PCR, secuenciación
VLλ 3		16	TCC TAT GAA CTG ACT CAG CCA CCC(T^{50}) T	PCR, secuenciación
VLλ 4a		17	TCT GAA CTG ACT CAG CCG($A^{33}T^{33}$) C(G^{50})CC TC*	PCR, secuenciación
VLλ 4b		18	TCT GAA CTG ACT CAG GAC CCT GC(T^{50})T*	PCR, secuenciación
VLλ 6		19	A(G^{50})AT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CAC TCT*	PCR, secuenciación
T3	n.º K457540 Invitrogen	20	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA	Secuenciación
T7		21	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Secuenciación
VL-atox as	Diseño interno	22	AGG CTG TCA TCC CAT GTT GCA CAG	PCR, secuenciación
VH-atox as		23	CTG CTG CTC CCA GAT CGT CTC GC	PCR, secuenciación

*Las bases entre paréntesis representan sustituciones en la posición previa y el número indica el porcentaje en el que se sustituyen los nucleótidos.

Ejemplo 2:

Especificidad de antígeno del anticuerpo monoclonal humano 243-4 (ELISA)

Se evaluó la especificidad de antígeno del anticuerpo 243-4 mediante la unión a un panel de toxinas bacterianas (toxina alfa: n.º 120, List Biological Laboratories; resto de las toxinas: producción propia, Kenta Biotech AG) en un ensayo de ELISA. Se realizó el ELISA en placas de microtitulación (n.º 439454, Nunc MaxiSorp) recubiertas con toxinas purificadas a una concentración de 1 μg/ml cada una. Tras la incubación durante la noche a temperatura ambiente se bloquearon las placas de microtitulación durante 2 h con BSA al 0,5% y se detectó la unión del AcM 243-4 (1 μg/ml) a toxinas inmovilizadas con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana conjugado con HRP a una dilución de 1:2000 (n.º 62-8420, Zymed Laboratories, Invitrogen). Se detuvieron las reacciones con HCI.

Se leyó la densidad óptica en un lector de ELISA a 490 nm usando el software Softmax Pro®, tal como se muestra en la figura 3.

Ejemplo 3:

Unión a la toxina alfa de cepas epidémicas de *S. aureus* en experimentos de inmunotransferencia

Se monitorizó la producción de toxina alfa de doce cepas epidémicas de *S. aureus* tras 16 h de crecimiento en medios BHI (n.º 255003, Becton Dickinson) a 37ºC. Se obtuvieron las cepas del centro de referencia alemán de *S. aureus* (Instituto Robert Koch, Wernigerode) y representan las cepas epidémicas más prevalentes que provocan actualmente infecciones por *S. aureus*. Algunas de estas cepas producen menos toxina alfa en comparación con otras, lo que da como resultado una fuerza de señal diferente.

Los diferentes genotipos de las cepas evaluadas se representan en la tabla 2. Tras el cultivo se sedimentaron bacterias mediante centrifugación y se normalizaron sobrenadantes de cultivo a DO_{600} = 0,6 de los cultivos bacterianos iniciales. Se cargaron 25 μl de cada sobrenadante en un gel de SDS-PAGE al 4-20% (n.º EC60252, Invitrogen) seguido por electrotransferencia durante 1 h. Se cargó un μg de toxina alfa purificada (n.º 120, List

Biological Laboratories) y se sometió a inmunotransferencia en paralelo como referencia. Tras el bloqueo con leche en polvo al 5% durante 1 h, se incubó la membrana de nitrocelulosa (n.º LC2000, Invitrogen) con 50 μg/ml de anticuerpo monoclonal humano 243-4 purificado. Se detectó finalmente la unión del anticuerpo 243-4 a la toxina alfa con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana conjugado con HRP a una dilución de 1:2000 (n.º 62-8420, Zymed Laboratories, Invitrogen, tal como se muestra en la figura 4.

Tabla 2

Panel de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) hospitalarias y extrahospitalarias de líneas clónicas representativas

Designación de inmunotransferencia	Número de aislado del Instituto Robert Koch	Tipo de MLST[*1]	CC[*2]	Tipo de secuencia de spa[*3]
1	93-00134	ST247	8	t051
2	06-00842	ST8	8	t008
3	06-02222	ST9	8	t008
4	06-01579	ST239	8	t031
5	06-00219	ST5	5	t002
6	06-00409	ST225	5	t003
7	06-01019	ST45	45	t1384
8	06-02182	ST22	22	t965
9	03-02773	ST1	1	t175
10	06-00373	ST8	8	t008
11	05-01089	ST22	22	t310
12	06-00300	ST80	80	t044

[*1]) Tipificación de secuencias de múltiples locus

[*2]) Complejo clónico

[*3]) Análisis de la región de repetición variable del gen de la proteína A (spa)

Ejemplo 4:

Determinación de la afinidad (mediante BIAcore)

Se midió la resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIAcore 2000 (BIAcore). Se realizaron todos los experimentos en tampón Mops 20 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM y BSA 0,1 mg/ml. En primer lugar, se inmovilizó anticuerpo de cabra anti-IgG humana (n.º 81-7100, Zymed Laboratories, Invitrogen) en un chip CM5 (BIAcore) a aproximadamente 13200 UR mediante acoplamiento de amina tal como se describe en el manual de BIAapplications. Además del recubrimiento covalente inicial, se unió el anticuerpo 243-4 al chip sensor a través de la interacción con el anticuerpo anti-IgG humana preinmovilizado, lo que produjo finalmente un nivel de inmovilización adicional de aproximadamente 240 UR. Para la caracterización cinética de la interacción antígeno-anticuerpo se inyectaron pulsos de concentraciones de toxina alfa crecientes (3,9 nM, 7,8 nM, 15,62 nM, 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, y 500 nM; n.º 120, List Biological Laboratories) a una velocidad de flujo de 50 μl/min. Tras cada ciclo de medición (5 min de asociación seguido por 30 min de disociación) se resolvió el complejo anticuerpo-antígeno mediante regeneración de la superficie con glicina 10 mM-HCl a pH 1,7. Para el cálculo de la constante de disociación del anticuerpo 243-4 se registraron las fases de asociación y disociación y se evaluaron mediante ajuste global usando el software BIAevaluation 4.1 (BIAcore AB, tal como se muestra en la figura 5). Para el análisis de ajuste global sólo se tuvieron en cuenta estas concentraciones de antígeno, lo que permitió el análisis siguiendo el modelo de unión 1:1 de Langmuir (≤ 125 nM, tabla 2) y tal como se explica resumidamente en el manual de BIAcore.

Tabla 3

Constantes cinéticas de la interacción cuantitativa toxina alfa - anticuerpo 243-4

Concentración de antígeno	k_{as} (l mol^{-1} s^{-1})	k_{dis} (s^{-1})	K_D (en M)
3,9 nM	$5,7 * 10^4$	$8,2 * 10^{-5}$	$1,4 * 10^{-9}$
7,8 nM	$6,1 * 10^4$	$1,0 * 10^{-5}$	$1,6 * 10^{-9}$
15,62 nM	$6,2 * 10^4$	$8,0 * 10^{-5}$	$1,3 * 10^{-9}$
31,25 nM	$6,3 * 10^4$	$9,7 * 10^{-5}$	$1,5 * 10^{-9}$
62,5 nM	$6,6 * 10^4$	$9,0 * 10^{-5}$	$1,4 * 10^{-9}$
125 nM	$6,2 * 10^4$	$8,9 * 10^{-5}$	$1,4 * 10^{-9}$
Valor medio	$6,2 * 10^4 \pm 0,3 * 10^4$	$8,9 * 10^{-5} \pm 0,7 * 10^{-5}$	$1,4 * 10^{-9} \pm 0,1 * 10^{-9}$

Ejemplo 5:

Modelo de cultivo tisular de lesión celular alveolar humana

Se sembraron en placas células epiteliales alveolares A549 humanas en medios RPMI (n.º R0883, Sigma-Aldrich) a una densidad de 3 x 10e5 células por pocillo. Se preincubaron concentraciones crecientes en paralelo de toxina alfa (5 μg/ml - 50 μg/ml; n.º 120, List Biological Laboratories) sólo con medios, 20 μg/ml de anticuerpo control de isotipo (IgG1 lambda humana, proteína de mieloma purificada; n.º I 5029, Sigma-Aldrich) o 20 μg/ml de anticuerpo monoclonal 243-4 purificado. Tras 4 h de incubación a 37ºC, se añadieron disoluciones de toxina alfa o anticuerpo anti-toxina alfa a las células y se continuó la incubación durante 16 h adicionales. Tras ese tiempo, se analizaron las células mediante el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) (n.º 04744934001, Roche), lo que proporciona una lectura para la liberación de LDH celular a los medios de cultivo, tal como se muestra en la figura 6.

Ejemplo 6:

Modelo de ratón de infección multiorgánica

Se aclimataron ratones Balb/c hembra (Charles River, Sulzfeld, Alemania), que pesaban 27-31 g durante 14 días antes de cirugía. Se obtuvieron los ratones del proveedor especificados como libres de patógenos. Para la colocación del catéter se anestesiaron los ratones por vía intraperitoneal con xilazina (8 mg/kg de peso corporal)/ketamina (100 mg/kg de peso corporal). Se practicó una incisión en la piel horizontal mínima en el lado izquierdo del cuello afeitado con el fin de colocar el catéter de polietileno de luz única (diámetro externo 0,6 mm, Föhr Medical Instruments, Seeheim, Alemania) en la vena cava superior. Veinticuatro horas tras la colocación del catéter, los ratones recibieron 1 x 10e7 UFC de cepa de *S. aureus* US300 (en 100 μl) y o bien 7,5 mg/kg de AcM 243-4 purificado o bien PBS (en 50 μl) a través del catéter. Dos días después, los ratones del grupo con tratamiento recibieron una segunda dosis de anticuerpo (5 mg/kg), mientras que los ratones del grupo control sólo recibieron PBS. Cinco días tras la cirugía se sacrificaron los ratones para monitorizar la carga bacteriana en el riñón y la formación de abscesos en el riñón. Por ese motivo, se recogieron de manera aséptica riñones de los animales sacrificados y se homogeneizaron en solución salina. Antes de la extracción de órganos se confirmó la ubicación del catéter en la vena cava superior y antes de la homogeneización de los riñones, se examinaron los órganos para determinar macroscópicamente la formación de abscesos. Finalmente, se cultivaron diluciones en serie de los homogeneizados de órganos en placas MPK durante al menos 48 h a 37ºC. Se calcularon las unidades formadoras de colonias (UFC) y se documentaron como UFC/riñón, tal como se muestra en la figura 7.

Tabla 4

Formación diferencial de abscesos en el riñón en animales del grupo con tratamiento y control

Grupo con tratamiento con AcM	Ratón 1	Sin formación de abscesos en ningún riñón
	Ratón 2	Sin formación de abscesos en ningún riñón
	Ratón 3	Sin formación de abscesos en ningún riñón
Grupo control	Ratón 4	Formación de abscesos considerable en ambos riñones
	Ratón 5	Formación de abscesos considerable en ambos riñones
	Ratón 6	No determinado puesto que el ratón murió antes de final del experimento

Bibliografía

Adlam C. *et al*., 1977: Effect of Immunization with Highly purified Alpha- and Beta-Toxins on Staphylococcal Mastitis in Rabbits. Infect and Immun. 17: 250-256.

Altschul S. *et al*., 1990: Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403.

Benetti P. H. *et al*., 1998: Expression and characterization of the recombinant catalytic subunit of casein kinase II from the yeast *Yarrowia lipolytica* in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif (13): 283-290.

Corbin B. D. *et al*., 2008: Metal Chelation and Inhibition of Bacterial Growth in Tissue Abscesses Science 319, 962-965.

DeLeo F. R. y Otto M., 2008: An antidote for *Staphylococcus aureus* pneumonia. J Exp Med 05 (2): 271-274.

Devereux J *et al*., 1984: A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX Nucleic Acids Research 12 (12): 387.

Goode R. L., Baldwin J. N., 1974. Comparison of purified alpha-toxins from various strains of *Staphylococcus aureus*. Appl Microbiol. 28 (1): 86-90.

Henikoff S. y Henikoff J. G., 1992: Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc Natl Acad Sci U S A. 15 de noviembre de 1992; 89 (22): 10915-9.

Heveker N. *et al*., 1994a: A human monoclonal antibody with the capacity to neutralize *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. Hum. Antibod. Hybridomas 5: 18-24.

Heveker N. *et al*., 1994b: Characterization of Neutralizing monoclonal Antibodies directed against *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. Hybridoma 13: 263-270.

Kapral F. A. *et al*., 1980. Formation of Intraperitoneal Abscesses by *Staphylococcus aureus*. Infect and Immun. 30: 204-211.

Kielian T. *et al*., 2001: Diminished Virulence of an Alpha-Toxin Mutant of *Staphylococcus aureus* in Experimental Brain Abscesses; Infect and Immun. (69), 6902-6911.

Levine MM. *et al*., 1983: New Knowledge on Pathogenesis of Bacterial Enteric Infections as Applied to Vaccine Development. Microbiol. Reviews (47), 510-550.

McElroy MC *et al*., 1999: Alpha-toxin damages the air-blood barrier of the lung in a rat model of *Staphylococcus aureus* induced pneumonia. Infect and Immun 67, 5541-5544.

Needleman S. B. Wunsch C. D. ,1970: A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J. Mol. Biol. 48: 443.

Persic L. *et al*., 1997: An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. Gene 10; 187 (1): 9-18.

Schwan W. R. *et al*., 2003: Loss of hemolysin expression in *Staphylococcus aureus* agr mutant correlates with selective survival during mixed infections in murine abscesses and wounds. FEMS Imm and Med Microbiol 28, 23-28.

Tzianabos A. O. *et al*., 2001: Structural rationale for the modulation of abscess formation by *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. PNAS 98: 9365-9370.

Von Köckrick-Blickwede M. *et al*., 2008: Immunological Mechanisms Underlying the Genetic Predisposition to Severe *Staphylococcus aureus* Infection in the Mouse Model. The American Journal of Pathology 173 (6), 1657-1668.

Wardenburg, J. B., y Schneewind O. 2008: Vaccine protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia. J. Exp. Med. 205: 287-294.

Wardenburg, J. B. *et al*., 2007: Poring over pores: alpha-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. Nat. Med. 13: 1405-1406.

Welschof M. *et al*.; 1995: Amino acid sequence based PCR primers for amplification of rearranged human heavy and light chain immunoglobulin variable region genes. J Immunol Methods. 179 (2): 203-14.

El documento WO2007/145689 Use of Alpha-Toxin for treating and preventing Staphylococcus infections.

Lista de secuencias

<110> Kenta Biotech AG

<120> Anticuerpo monoclonal humano contra la toxina alfa derivada de *S. aureus* y su uso en el tratamiento o la prevención de la formación de abscesos

<130> PCT6530HV200pau

<140> aún no cedida
<141> 10-08-2010

<150> 09 010 311.0
<151> 10-08-2009

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature
<223> CDR1, cadena ligera

<400> 1
Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr
1 5

<210> 2
<211> 3
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<223> CDR2, cadena ligera

<400> 2
Thr Asn Asn
1

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<223> CDR3, cadena ligera

<400> 3
Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Leu Tyr Val
1 5 10

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<223> CDR1, cadena pesada

<400> 4
Gly Tyr Lys Phe Gly Thr His Trp

1 5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<223> CDR2, cadena pesada

<400> 5
Ile His Pro Ala Asp Ser Glu Thr
1 5

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<223> CDR3, cadena pesada

<400> 6
Ala Arg Arg Ser Gly Ser Ser Ser Trp Tyr Ala Leu Asp Phe
1 5 10

<210> 7
<211> 123
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<223> región variable, cadena ligera

<400> 7
Gln Ser Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg
5 10 15

Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr
35 40 45 50

Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser
55 60 65

Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala
70 75 80 85

Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Leu Tyr Val Phe
90 95 100

Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Ile
105 110 115

Val Thr Leu Phe
120

<210> 8
<211> 129
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<223> región variable, cadena pesada

<400> 8

Glu Val Gln Met Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Pro
5 10 15

Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Lys Phe Gly Thr His Trp Ile
20 25 30

Gly Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile
35 40 45 50

His Pro Ala Asp Ser Glu Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val
55 60 65

Ser Phe Ser Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu His Trp Ser Thr
70 75 80 85

Leu Arg Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ser Gly Ser
90 95 100

Ser Ser Trp Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
105 110 115

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
120 125

<210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 9
gaccgatggg cccttggtgg a 21

<210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 10
caggtgcagc tggtgcagtc t 21

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 11
caggtgcagc tgcaggagtc 20

<210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 12
gaggtgcagc tggtggagtc t 21

<210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 13
agaggagggg aacagagtga c 21

<210> 14
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 14
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctca 27

<210> 15
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 15
cagtctgcgc tgactcaacc ggcctct 27

<210> 16
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 16
tcctatgaac tgactcagcc accct 25

<210> 17
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 17
tctgaactga ctcagccgcc ctc 23

<210> 18
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 18

tctgaactga ctcaggaccc tgct 24

<210> 19
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 19
aattttatgc tgactcagcc ccactct 27

<210> 20
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de secuenciación

<400> 20
attaaccctc actaaaggga 20

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de secuenciación

<400> 21
taatacgact cactataggg 20

<210> 22
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 22
aggctgtcat cccatgttgc acag 24

<210> 23
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador de PCR

<400> 23
ctgctgctcc cagatcgtct cgc 23

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal específico para la toxina alfa de *S. aureus*, en el que la región variable de la cadena ligera del anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 1 en la región CDR1, la SEQ ID NO: 2 en la región CDR2 y la SEQ ID NO: 3 en la región CDR3, y en el que la región variable de la cadena pesada del anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 4 en la región CDR1, la SEQ ID NO: 5 en la región CDR2 y la SEQ ID NO: 6 en la región CDR3, o un fragmento del mismo que puede unirse a la toxina alfa de *S. aureus*, en el que el fragmento es un fragmento Fab o $F(ab')_2$ o una mezcla de los mismos.

2. Anticuerpo monoclonal específico para la toxina alfa de *S. aureus*, en el que la región variable de la cadena ligera del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y la región variable de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, o un fragmento Fab o $F(ab')_2$ o una mezcla de los mismos que puede unirse a la toxina alfa de *S. aureus*.

3. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.

4. Anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cadena ligera es del tipo lambda.

5. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la cadena pesada es del tipo IgG.

6. Anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo puede unirse específicamente a las formas monomérica y oligomérica de la toxina alfa de *S. aureus*.

7. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo está modificado en el extremo N-terminal, internamente o en el extremo C-terminal.

8. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 7, en el que la modificación se selecciona de al menos una de oligomerización, glicosilación o conjugación con un fármaco o un marcador.

9. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que puede obtenerse a partir de una célula B de mamífero o un hibridoma obtenido mediante la fusión de dicha célula B de mamífero con una célula de mieloma o heteromieloma.

10. Hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 ó 9.

11. Ácidos nucleicos que codifican para la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 ó 9.

12. Vector que comprende los ácidos nucleicos que codifican para la cadena ligera y la cadena pesada según la reivindicación 11.

13. Vector según la reivindicación 12, en el que el vector también comprende un promotor ligado operativamente al ácido nucleico para facilitar la expresión del mismo.

14. Célula huésped aislada que comprende el vector según la reivindicación 13 o los ácidos nucleicos según la reivindicación 11.

15. Método para producir el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 ó 9 que comprende cultivar el hibridoma según la reivindicación 10 en condiciones que permiten la secreción de un anticuerpo o cultivar la célula huésped según la reivindicación 14 en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo monoclonal.

16. Composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 1 a 8 o los ácidos nucleicos según la reivindicación 11 y un portador o componente farmacéuticamente aceptable.

17. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o los ácidos nucleicos según la reivindicación 11, para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una formación de abscesos en un órgano, en el que la formación de abscesos está provocada por *S. aureus*.

18. Uso de un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o los ácidos nucleicos según la reivindicación 11 para la preparación de una composición farmacéutica para la profilaxis o el tratamiento de una formación de abscesos en un órgano, en el que la formación de abscesos está provocada por *S. aureus*.

19. Uso de un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 17 ó 18, en el que el absceso en un órgano es un absceso abdominal.

20. Uso de un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 18, en el que el órgano es riñón, corazón, hígado, pulmón, cerebro, piel o bazo.

21. Kit de prueba para el diagnóstico de una infección por *S. aureus* en una muestra que comprende al menos un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o los ácidos nucleicos según la reivindicación 11.

Figura 1:

VH

GAG GTG CAG ATG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCG GGG GAA CCT CTG AAG
Glu Val Gln Met Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Pro Leu Lys

ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AAG TTT GGC ACC CAC TGG ATC GGC TGG GTG CGC
Ile Ser Cys Lys Gly Ser **Gly Tyr Lys Phe Gly Thr His Trp** Ile Gly Trp Val Arg
CDR1

CAG AGG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGA ATC ATC CAT CCT GCT GAC TCT GAA
Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile **Ile His Pro Ala Asp Ser Glu**
CDR2

ACC AAG TAC AGC CCG TCA TTC CAA GGC CAG GTC TCT TTC TCA GCC GAC AAG TCC AGC
Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Ser Phe Ser Ala Asp Lys Ser Ser

AAT ACC GCC TAC CTA CAT TGG AGC ACC CTG AGG GCC TCG GAC ACC GCC ATG TAT TAC
Asn Thr Ala Tyr Leu His Trp Ser Thr Leu Arg Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr

TGT GCG AGA CGA TCT GGG AGC AGC AGT TGG TAT GCT CTT GAT TTC TGG GGC CAA GGG
Cys **Ala Arg Arg Ser Gly Ser Ser Ser Trp Tyr Ala Leu Asp Phe** Trp Gly Gln Gly
CDR3

ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCC GTC
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

Figura 2:

VL

CAG TCT GTG CTG ACT CAG TCA CCC TCA GCG TCG GGG ACC CCC GGG CAG AGG GTC ACC
Gln Ser Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr

ATC TCT TGT TCT GGA GGC AGC TCC AAC ATC GGA AGT AAT ACT GTA AAT TGG TAC CAA
Ile Ser Cys Ser Gly Gly **Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr** Val Asn Trp Tyr Gln
CDR1

CAG TTC CCA GGA GCG GCC CCC AAA CTC CTC ATC TAT ACT AAT AAT CAG CGG CCC TCA
Gln Phe Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr **Thr Asn Asn** Gln Arg Pro Ser
CDR2

GGG GTC CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC CTG GCC ATC
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile

AGT GGG CTC CAG TCT GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGT GCA ACA TGG GAT GAC AGC
Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys **Ala Thr Trp Asp Asp Ser**
CDR3

CTA AAT GGC CTT TAC GTC TTC GGA ACT GGG ACC AAG GTC ACC GTC CTA GGT CAG CCC
Leu Asn Gly Leu Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro
CDR3

AAG GCC AAC CCC ACT GTC ACT CTG TTC
Lys Ala Asn Pro Ile Val Thr Leu Phe

Figura 3:

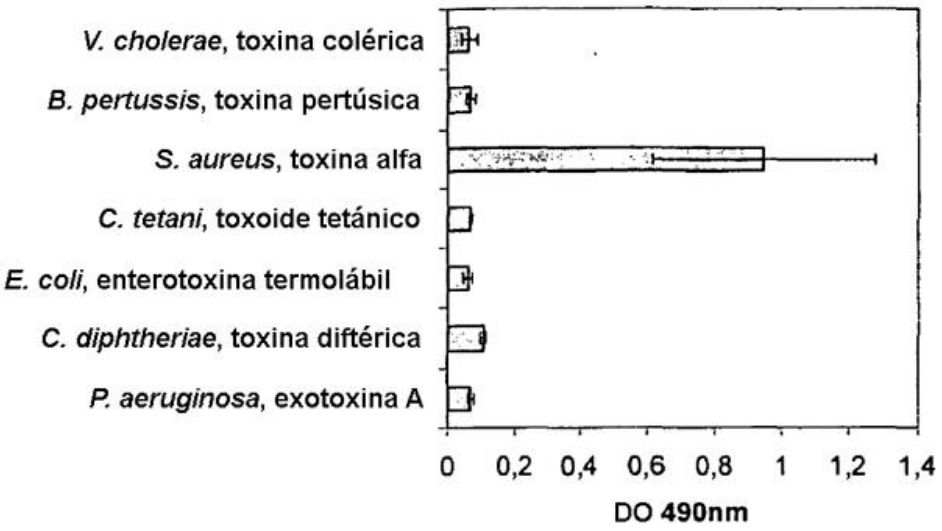

V. cholerae, toxina colérica
B. pertussis, toxina pertúsica
S. aureus, toxina alfa
C. tetani, toxoide tetánico
E. coli, enterotoxina termolábil
C. diphtheriae, toxina diftérica
P. aeruginosa, exotoxina A
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1
1,2
1,4
DO 490nm

Figura 4:

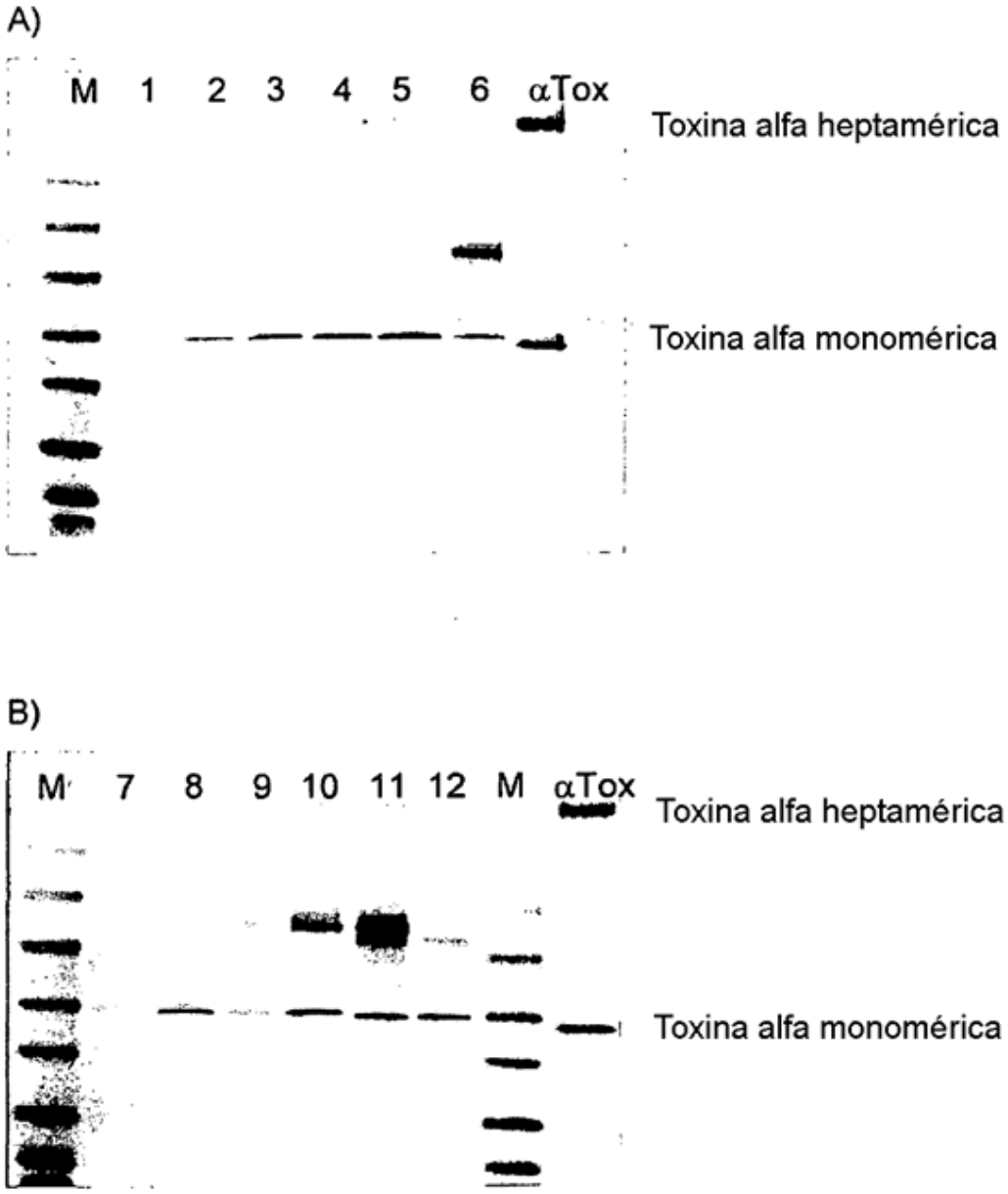

A)
M 1 2 3 4 5 6 αTox
Toxina alfa heptamérica
Toxina alfa monomérica
B)
M 7 8 9 10 11 12 M αTox
Toxina alfa heptamérica
Toxina alfa monomérica

Figura 5:

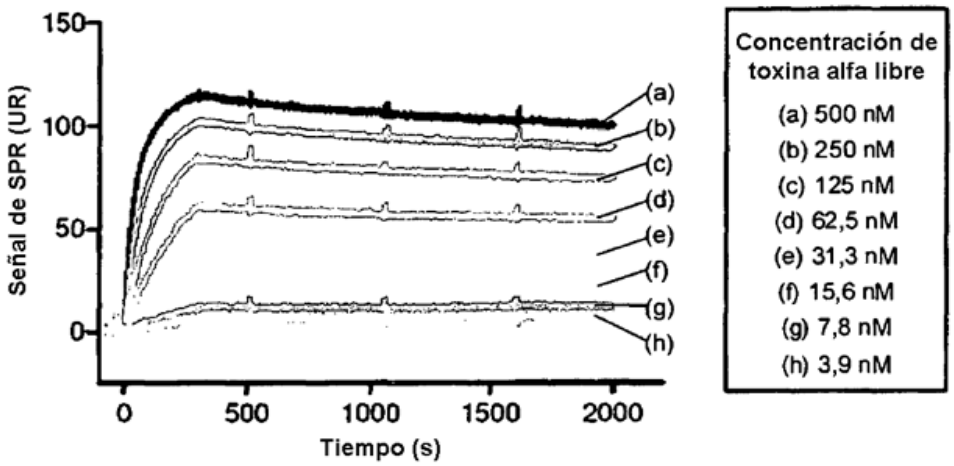

150
100
50
0
Señal de SPR (UR)
0
500
1000
1500
2000
Tiempo (s)
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
Concentración de toxina alfa libre
(a) 500 nM
(b) 250 nM
(c) 125 nM
(d) 62,5 nM
(e) 31,3 nM
(f) 15,6 nM
(g) 7,8 nM
(h) 3,9 nM

Figura 6:

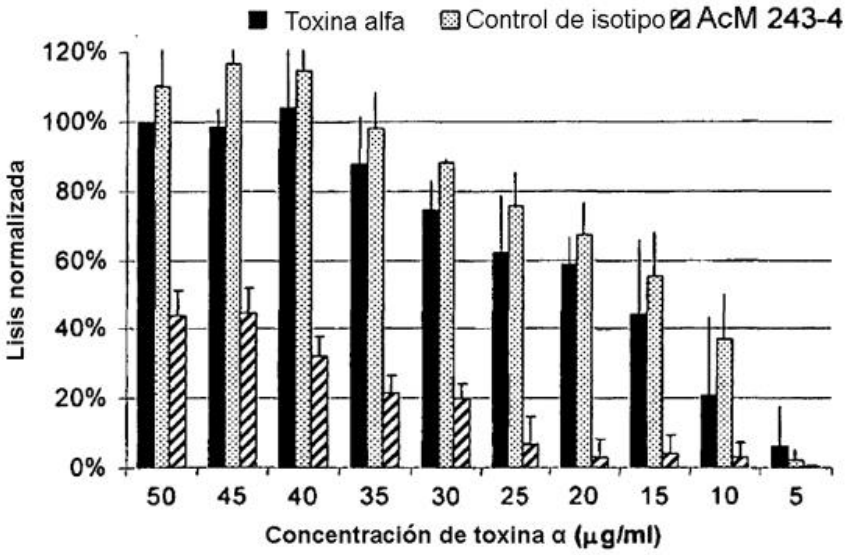
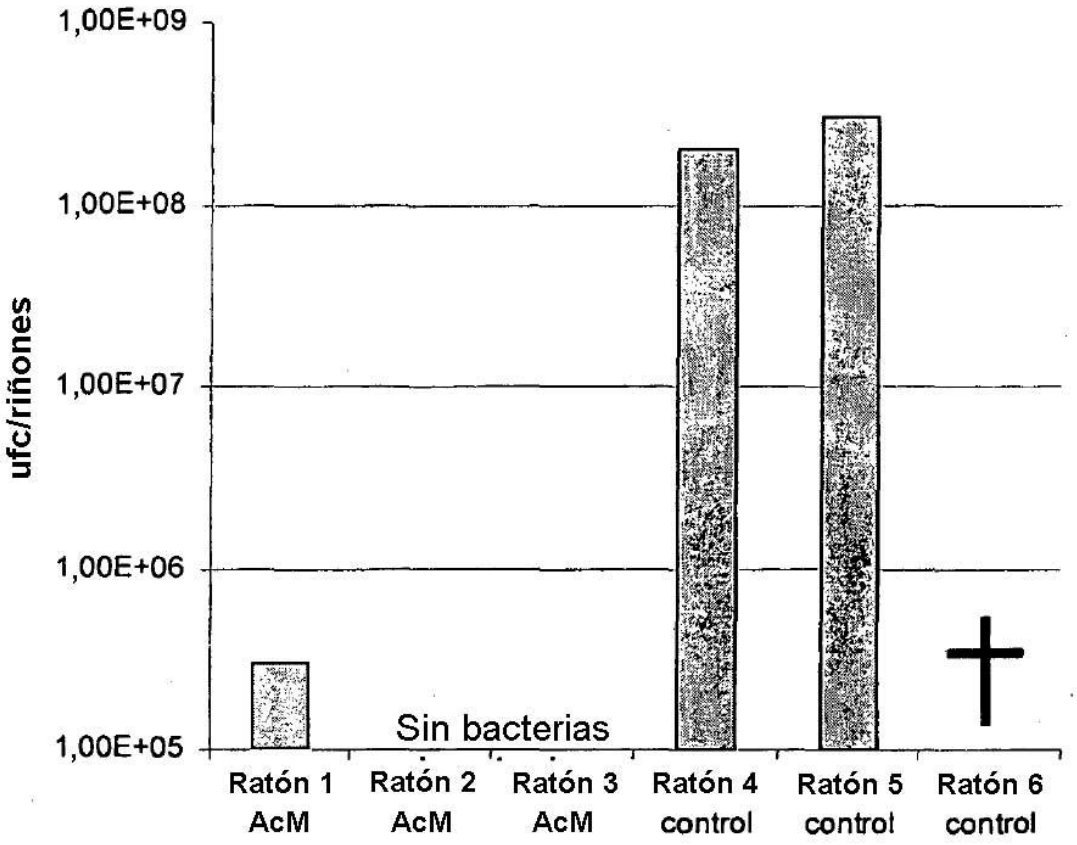

Toxina alfa
Control de isotipo
AcM 243-4
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Lisis normalizada
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
Concentración de toxina α (µg/ml)

Figura 7:


1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
1,00E+05
ufc/riñones
Sin bacterias
Ratón 1 AcM
Ratón 2 AcM
Ratón 3 AcM
Ratón 4 control
Ratón 5 control
Ratón 6 control