

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 964**

51 Int. Cl.:

A61K 39/07 (2006.01)

A61K 39/085 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2006 E 10075018 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2213297**

54 Título: **Polipéptidos antigénicos de Staphylococcus aureus**

30 Prioridad:

23.03.2005 GB 0505949

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

06.04.2015

73 Titular/es:

**ABSYNTH BIOLOGICS LIMITED (100.0%)
131 Mount Pleasant, Liverpool Science Park,
Innovation Centre 1
Liverpool L3 5TF, GB**

72 Inventor/es:

**FOSTER, SIMON J. y
GARCIA LARA, JORGE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 532 964 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

Polipéptidos antigénicos de *Staphylococcus aureus*

La invención se refiere a polipéptidos antigénicos expresados por microbios patógenos, a vacunas que contienen los polipéptidos antigénicos y a anticuerpos terapéuticos dirigidos a los polipéptidos antigénicos.

5 **Antecedentes**

Un problema al que se enfrenta el desarrollo médico habitual es a la evolución de las cepas resistentes a antibióticos de diversos microbios patógenos significativos. Un ejemplo de un organismo patógeno que ha desarrollado resistencia a antibióticos es *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* es una bacteria cuyo hábitat normal es el revestimiento epitelial de la nariz en aproximadamente 20-40% de las personas sanas normales y se encuentra también usualmente en la piel de las personas sin provocarles generalmente daño. Sin embargo, en ciertas circunstancias, particularmente cuando la piel está dañada, este germen puede causar infección. Esto es un problema particular en los hospitales, donde los pacientes pueden ser sometidos a procesos quirúrgicos y/o tomar fármacos inmunosupresores. Estos pacientes son mucho más vulnerables a la infección por *S. aureus* debido al tratamiento que han recibido. En los últimos años han surgido cepas resistentes de *S. aureus*. Son predominantes las cepas resistentes a la metilina y muchas de estas cepas resistentes son también resistentes a otros diversos antibióticos. Actualmente, no existe un procedimiento de vacunación eficaz para *S. aureus*.

La presente invención se refiere a la identificación de los componentes potenciales de vacunas y se evitan o reducen terapias frente al problema de las cepas patógenas directamente resistentes.

Entre los aproximadamente 4100 genes en el cromosoma de la bacteria gram-positiva *Bacillus subtilis*, 271 son indispensables ("esenciales") para el crecimiento y entre ellos 23 tiene papeles no definidos en la fisiología del organismo (*gcp*, *obg*, *ppaC-yybQ*-, *trmU*, *yacA*, *yacM*, *ydiB*, *ydiC*, *yjbN*, *ykqC*, *ylnA*, *yloQ*, *ylqF*, *ymdA*, *yneS*, *yphC*, *yqeH*, *yqeI*, *yqjK*, *yrvO*, *ysxC*, *ytaG*, *ywIC*) (Kunst *et al.*, 1997). Homólogas de las proteínas codificadas por estos genes se pueden encontrar en las diversas cepas secuenciadas hasta ahora de otra bacteria gram-positiva, la bacteria patógena humana *Staphylococcus aureus*. Entre ellos, los genes ortólogos *Gcp* e *YneS* predicen proteínas de membrana (véase el Apéndice I), mientras que el resto predice proteínas citoplásmicas (datos no mostrados). No obstante, se ha demostrado que *Obg* está parcialmente unido a membranas en *B. subtilis* (Kobayashi *et al.*, 2001).

Los autores de la presente invención han aislado ciertos polipéptidos que son componentes esenciales para el crecimiento de las bacteria patógenas *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* y han producido antisueros contra estos polipéptidos. Se encontró que los antisueros producidos contra los polipéptidos *Bacillus subtilis* daban como resultado la eliminación extremadamente potente de *Staphylococcus aureus*. Este efecto no podía predecirse.

Los presentes hallazgos facilitan el desarrollo de vacunas y terapias con anticuerpos que mitigan algunos de los problemas de las terapias habituales, tal como la resistencia a antibióticos.

Breve resumen de la descripción

La presente invención proporciona polipéptidos antigénicos que son esenciales para el crecimiento de las bacterias gram-positivas *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* y que son útiles en el tratamiento o prevención de infecciones microbianas.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido antigénico codificado por una secuencia aislada de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en:

- i) una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de nucleótidos de la Figura 1a;
 - 40 ii) una secuencia de ácidos nucleicos que está degenerada como resultado del código genético a la secuencia de ácidos nucleicos definida en (i) anterior y que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la Figura 2a; y
 - iii) una molécula de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la Figura 2a.
- 45 En un aspecto preferido de la invención, se proporciona una vacuna que comprende un polipéptido antigénico de acuerdo con la invención.

El polipéptido antigénico de acuerdo con la invención es una proteína de la membrana celular.

Preferiblemente, el polipéptido antigénico de acuerdo con la invención es expresado por un organismo patógeno, por ejemplo, una bacteria, un virus o una levadura. Preferiblemente, el organismo patógeno es una bacteria. La bacteria puede ser una bacteria gram-positiva o gram-negativa, preferiblemente una bacteria gram-positiva.

La bacteria se puede seleccionar del grupo que consiste en:

5 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Enterococcus faecalis*; *Mycobacterium tuberculosis*; *Streptococcus* del grupo B; *Streptococcus pneumoniae*; *Helicobacter pylori*; *Neisseria gonorrhoea*; *Streptococcus* del grupo A; *Borrelia burgdorferi*; *Coccidioides immitis*; *Histoplasma capsulatum*; *Neisseria meningitidis* del tipo B; *Shigella flexneri*; *Escherichia coli*; *Haemophilus influenzae*; *Lysteria monocytogenes*; *Bacillus anthracis*; *Corynebacterium diphtheriae*; *Clostridium tetani*; *Mycoplasma* spp. y *Treponema pallidum*.

Preferiblemente, la bacteria es del género *Staphylococcus* spp. Preferiblemente incluso la bacteria es *Staphylococcus aureus*.

En una realización preferida de la invención, el polipéptido antigénico de acuerdo con la invención está asociado a una patogenicidad infecciosa de un organismo como se ha definido en la presente memoria.

10 En un aspecto más preferido de la invención, el polipéptido antigénico consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2a.

El polipéptido antigénico de acuerdo con la invención puede comprender un antígeno no proteínico, por ejemplo, un antígeno polisacárido.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "polipéptido" significa, en términos generales, una pluralidad de residuos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Se usan intercambiamente y significan lo mismo péptido, proteína, oligopéptido u oligómero.

De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.

20 El vector de acuerdo con la invención puede ser un plásmido, cósmido o fago. El vector puede incluir una secuencia de control de la transcripción (secuencia promotora) que media la expresión específica de la célula, por ejemplo, una secuencia promotora inducible o constitutiva, específica de la célula. El vector puede ser un vector de expresión adaptado para la expresión génica procariota o eucariota, por ejemplo, el vector puede incluir uno o más marcadores seleccionables y/o secuencias de replicación autónomas que faciliten el mantenimiento del vector en una célula eucariota o un hospedante procariota (Sambrook *et al.*, (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY y las referencias citadas en dicho texto; Marston, F. (1987) *DNA Cloning Techniques: A Practical Approach*, Vol. III, IRL Press, Oxford UK; *DNA Cloning*: F. M. Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994). Los vectores que se mantienen autónomamente se denominan vectores episómicos.

25 Promotor es un término reconocido en la técnica y puede incluir elementos potenciadores que son secuencias de ácidos nucleicos que actúan *in cis* encontrados con frecuencia en la posición 5' con relación al sitio de iniciación de la transcripción de un gen (los potenciadores se pueden encontrar también en la posición 3' con relación a una secuencia de un gen o incluso estar situados en secuencias intrónicas y por consiguiente ser independientes de la posición). La actividad potenciadora es sensible a los factores de transcripción que actúan *in trans* (polipéptidos) que han demostrado unirse específicamente a elementos potenciadores. La unión/actividad de los factores de transcripción (véase *Eukaryotic Transcription Factors*, de David S. Latchman, Academic Press Ltd, San Diego) es sensible a varias señales medioambientales que incluyen metabolitos intermedios (por ejemplo, glucosa, lípidos), factores medioambientales (por ejemplo, luz, calor).

30 Los elementos promotores incluyen también las llamadas secuencias caja TATA y de selección de la iniciación de la RNA-polimerasa (RIS) que actúan seleccionando un sitio de iniciación de la transcripción. Estas secuencias se unen también a polipéptidos que actúan, entre otros modos, facilitando la selección de iniciación de la transcripción por la RNA-polimerasa.

El vector de acuerdo con la invención puede incluir secuencias de terminación de la transcripción o de poliadenilación. También puede incluir sitios internos de entrada al ribosoma (IRES). El vector puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos que está dispuesta en una casete de expresión bi-cistrónica o multi-cistrónica.

45 Los autores de la presente invención describen un método para la producción de un polipéptido antigénico recombinante de acuerdo con cualquier aspecto previo de la invención, que comprende:

- (i) proporcionar una célula transformada/transfectada con un vector de acuerdo con la invención;
- (ii) dejar crecer dicha célula en condiciones adecuadas para la producción de dicho polipéptido; y
- (iii) purificar dicho polipéptido de dicha célula o de su medio de crecimiento.

50 En un aspecto preferido de la invención, el vector codifica una señal de secreción para facilitar la purificación de dicho polipéptido y por tanto se proporciona con ella dicho polipéptido recombinante.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una célula o línea celular transformada o transfectada con el vector de acuerdo con la invención.

En una realización preferida de la invención, dicha célula es una célula procariota, por ejemplo, una levadura o una bacteria, tal como *E. coli*. Alternativamente, dicha célula es una célula eucariota, por ejemplo, células de hongos, insectos, anfibios, mamíferos, por ejemplo, COS, CHO, de melanoma de Bowes y otras células humanas adecuadas, o células vegetales.

- 5 De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una vacuna que comprende un polipéptido antigénico de acuerdo con la invención. Preferiblemente, dicha vacuna comprende además un vehículo y/o adyuvante.

Los términos adyuvante y vehículo han de entenderse de la siguiente manera. Algunos antígenos polipeptídicos o peptídicos contienen epítopos de linfocitos B pero no epítopos de linfocitos T. Las respuestas inmunitarias pueden mejorar mucho por la inclusión de un epítipo de linfocitos T en el polipéptido/péptido o por la conjugación del polipéptido/péptido con una proteína transportadora inmunógena, tal como la hemocianina de lapa californiana o el toxoide del tétano, que contienen múltiples epítopos de linfocitos T. El conjugado es absorbido por las células que presentan el antígeno, procesado y presentado por moléculas de antígenos leucocitarios humanos (HLA) de la clase II. Esto permite que la ayuda de linfocitos T sea proporcionada por los epítopos derivados del vehículo específicos del linfocito T al linfocito B que es específico del polipéptido/péptido antigénico original. Esto puede conducir al aumento de la producción, secreción y conmutación del isotipo del anticuerpo.

Un adyuvante es una sustancia o procedimiento que aumenta las respuestas inmunitarias específicas a antígenos modulando la actividad de las células inmunitarias. Ejemplos de adyuvantes incluyen, por ejemplo, solamente anticuerpos agonistas para moléculas co-estimuladoras, adyuvante de Freund, muramil-dipéptidos y liposomas. Un adyuvante es por tanto un inmunomodulador. Un vehículo es una molécula inmunógena que, cuando está unida a una segunda molécula, aumenta las respuestas inmunitarias a esta última.

Los autores de la presente invención describen un método para inmunizar a un animal contra un microbio patógeno que comprende administrar a dicho animal un polipéptido de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el polipéptido está en forma de una vacuna de acuerdo con la invención.

Preferiblemente, el animal es un ser humano.

25 Preferiblemente, el polipéptido antigénico o vacuna se puede adaptar para ser administrado por inyección directa por vía bien intravenosa, intramuscular o subcutánea. Incluso, la vacuna o polipéptido antigénico se puede adaptar para ser tomado por vía oral. El polipéptido o vacuna se puede administrar en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tales como los diversos medios acuosos y lípidos, tal como solución salina estéril, utilizados para la preparación de soluciones inyectables para ser administradas por vía intramuscular y subcutánea. Se pueden emplear agentes de puesta en suspensión y dispersantes convencionales. Para los expertos en la técnica serán evidentes otros medios de administración, tales como implantes, por ejemplo un pelet bioabsorbible de liberación prolongada de bajas dosis.

La vacuna puede ser contra las especies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *B. anthracis* y *Listeria monocytogenes*.

35 Será también evidente que las vacunas o polipéptidos antigénicos son eficaces para prevenir o aliviar estados morbosos en animales distintos de seres humanos, por ejemplo, aunque sin limitación, mascotas (por ejemplo, animales domésticos tales como gatos y perros), ganado (por ejemplo, ganado bovino, ovejas, cerdos) y caballos.

Un aspecto adicional de la invención proporciona una composición de vacuna que comprende una cantidad eficaz de un polipéptido de la invención. Estos polipéptidos también pueden incluir un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

40 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un anticuerpo, o al menos una de sus partes que se una eficazmente, que se une al menos a un polipéptido antigénico, o a una de sus partes, de acuerdo con la invención.

Puesto que los anticuerpos se pueden modificar de varios modos, el término "anticuerpo" debe interpretarse que abarca cualquier miembro o sustancia de unión que tenga un dominio de unión con la especificidad requerida para el polipéptido antigénico. Así, este término abarca fragmentos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión a inmunoglobulinas, tanto natural, total o parcialmente sintéticas. Por tanto, también están incluidas las moléculas quiméricas que comprendan un dominio de unión a inmunoglobulinas, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos están descritas en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023.

50 En un aspecto preferido de la invención, dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal o monoclonal.

En un aspecto más preferido de la invención, dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico producido por métodos recombinantes de modo que contenga la región variable de dicho anticuerpo con una región invariable o constante de un anticuerpo humano.

En un aspecto más preferido de la invención, dicho anticuerpo se humaniza por métodos recombinantes de modo

que se combinen las regiones determinantes de la complementariedad de dicho anticuerpo tanto con las regiones constantes (C) como con las regiones de armazón de las regiones variables (V) de un anticuerpo humano.

Preferiblemente, dicho anticuerpo se provee de un marcador que incluye una etiqueta, por ejemplo un marcador radiactivo y/o fluorescente y/o epitópico.

- 5 Preferiblemente, dicho anticuerpo monoclonal humanizado para dicho polipéptido se produce en forma de un polipéptido de fusión en un vector de expresión adaptado adecuadamente para la transfección o transformación de células procariotas o eucariotas.

10 Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas, son moléculas proteínicas que tienen especificidad para moléculas extrañas (antígenos). Las inmunoglobulinas (Ig) son una clase de proteínas estructuralmente relacionadas que consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (L) (bajo peso molecular) (κ o λ) y un par de cadenas pesadas (H) (γ , α , μ , δ y ϵ), las cuatro unidas entre sí por enlaces disulfuro. Tanto las cadenas H como L tienen regiones que contribuyen a la unión al antígeno y que son altamente variables entre una y otra molécula de Ig. Además, las cadenas H y L contienen regiones que son no variables o constantes.

15 Las cadenas L constan de dos dominios. El dominio del extremo carboxi tiene las cadenas L de un tipo dado esencialmente idénticas y se denomina la región "constante" (C). El dominio del extremo amino varía de una cadena L a otra cadena L y contribuye al sitio de unión del anticuerpo. Debido a su variabilidad, se denomina la región "variable" (V).

20 Las cadenas H de las moléculas de Ig son de varias clases, α , μ , σ y γ (de las cuales existen varias sub-clases). El nombre de una molécula de Ig ensamblada que consiste en una o más unidades de dos cadenas H y L idénticas, procede de la cadena H que posea. Así, existen cinco isotipos de Ig: IgA, IgM, IgD, IgE e IgG (con cuatro sub-clases basadas en las diferencias de las cadenas H, es decir IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Más detalles con relación a la estructura de los anticuerpos y sus diversas funciones se pueden encontrar en *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (Véase antes).

25 Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos recombinantes en los que están combinadas todas las regiones V de un anticuerpo de ratón o rata con las regiones C de un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos híbridos recombinantes que fusionan las regiones determinantes de la complementariedad de una región V de un anticuerpo de roedor con las regiones de armazón de las regiones V de un anticuerpo humano. También se usan regiones C del anticuerpo humano. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) son las regiones en el dominio del extremo N tanto de la cadena pesada como ligera del anticuerpo en donde está restringida la mayoría de las variaciones de la región V. Estas regiones forman bucles en la superficie de la molécula del anticuerpo. Estos bucles proporcionan la superficie de unión entre el anticuerpo y el antígeno.

35 Los anticuerpos de animales no humanos provocan una respuesta inmunitaria al anticuerpo extraño y su eliminación de la circulación. Tanto los anticuerpos quiméricos como humanizados tienen una antigenicidad reducida cuando se inyectan a un sujeto humano debido a que existe una cantidad reducida de anticuerpo de roedor (es decir, extraño) dentro del anticuerpo híbrido recombinante, mientras que las regiones del anticuerpo humano no provocan una respuesta inmunitaria. Esto da como resultado una respuesta inmunitaria más débil y una disminución en la eliminación del anticuerpo. Esto es claramente deseable cuando se usan anticuerpos terapéuticos en el tratamiento de enfermedades humanas. Los anticuerpos humanizados se diseñan de modo que tengan menos regiones de anticuerpos "extraños" y por consiguiente se piensa que son anticuerpos menos inmunógenos que quiméricos.

40 En una realización más preferida de la invención, dichos anticuerpos son anticuerpos cuya actividad está mediada por el complemento, por ejemplo, la actividad del anticuerpo puede ser activada por el complemento.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica los anticuerpos humanizados o quiméricos de acuerdo con la invención.

45 Todavía en otro aspecto de la invención, se proporciona una célula o línea celular que comprende el vector que codifica el anticuerpo humanizado o quimérico de acuerdo con la invención. La célula o línea celular puede ser transformada o transfectada con el vector que codifica el anticuerpo humanizado o quimérico de acuerdo con la invención.

Los autores de la presente invención describen también una línea celular hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal como se ha descrito anteriormente.

50 Los autores de la presente invención describen también un método para producir anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención usando líneas celulares hibridomas como se ha descrito anteriormente.

Los autores de la presente invención describen un método para la producción del anticuerpo humanizado o quimérico que se ha descrito anteriormente, que comprende:

- (i) proporcionar una célula transformada o transfectada con un vector que comprende una molécula de ácidos

nucleicos que codifica el anticuerpo humanizado o quimérico de acuerdo con la invención;

(ii) dejar crecer dicha célula en condiciones adecuadas para la producción de dicho anticuerpo; y purificar dicho anticuerpo de dicha célula o de su medio de crecimiento.

5 Los autores de la presente invención describen también un método para preparar una línea celular hibridoma que comprende las etapas de:

i) inmunizar un mamífero inmunocompetente con un inmunógeno que comprende al menos un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se representa en la Figura 2, o uno de sus fragmentos;

ii) fusionar linfocitos del mamífero inmunocompetente inmunizado con células de mieloma para formar las células de hibridoma;

10 iii) cribar los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma de la etapa (ii) para la actividad de unión a las secuencias de aminoácidos de (i);

iv) cultivar las células de hibridoma para que proliferen y/o segreguen dicho anticuerpo monoclonal; y

v) recuperar el anticuerpo monoclonal del líquido sobrenadante de cultivo.

El mamífero inmunocompetente puede ser un ratón, una rata o un conejo.

15 La producción de anticuerpos monoclonales utilizando células de hibridoma es muy conocida en la técnica. Los métodos usados para producir anticuerpos monoclonales han sido descritos por Kohler and Milstein en *Nature* 256, 495-497 (1975) y también por Donillard and Hoffman, "Basic Facts about Hybridomas" en *Compendium of Immunology* V.II ed. by Schwartz, 1981, que se incorporan como referencia.

20 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un polipéptido antigénico de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una infección microbiana.

Preferiblemente, la infección microbiana es una infección bacteriana causada por un patógeno bacteriano procedente de una especie bacteriana seleccionada del grupo que consiste en: *Staphylococcus* spp, por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*; *Enterococcus* spp, por ejemplo, *Enterococcus faecalis*; *Lysteria* spp; *Pseudomonas* spp; *Mycobacterium* spp, por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*; *Enterobacter* spp; *Campylobacter* spp; *Salmonella* spp; *Streptococcus* spp, por ejemplo, *Streptococcus* del grupo A o B, *Streptococcus pneumoniae*; *Helicobacter* spp, por ejemplo, *Helicobacter pylori*; *Neisseria* spp, por ejemplo, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*; *Borrelia burgdorferi* spp; *Shigella* spp, por ejemplo, *Shigella flexneri*; *Escherichia coli* spp; *Haemophilus* spp, por ejemplo, *Haemophilus influenzae*; *Chlamydia* spp, por ejemplo, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*; *Francisella tularensis*; *Bacillus* spp, por ejemplo, *Bacillus anthracis*; *Clostridia* spp, por ejemplo, *Clostridium botulinum*; *Yersinia* spp, por ejemplo, *Yersinia pestis*; *Treponema* spp; *Burkholderia* spp, por ejemplo, *Burkholderia mallei* y *B. pseudomallei*.

Los autores de la presente invención describen también afecciones relacionadas con bacterias que puede ser una afección asociada a *Staphylococcus aureus*. Una afección asociada a *Staphylococcus aureus* puede incluir, por ejemplo, septicemia; tuberculosis; intoxicación alimentaria asociada a bacterias; infecciones sanguíneas; peritonitis; endocarditis; osteomielitis; septicemia; afecciones cutáneas; meningitis; neumonía; úlceras estomacales; gonorrea; faringitis estreptocócica; choque tóxico asociado a estreptococos; fascitis necrotizante; impétigo; histoplasmosis; enfermedad de Lyme; gastroenteritis; disentería; y shigelosis.

En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de anticuerpos de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección por *Staphylococcus aureus*.

40 A lo largo de la descripción y en las reivindicaciones de esta memoria, las palabras "comprenden" y "contienen" y sus variaciones, por ejemplo, "que comprenden" y "comprende", significan "que incluyen aunque sin limitación" y no se pretende excluir (ni no excluir) otros restos, aditivos, componentes, números enteros o etapas.

A lo largo de la descripción y en las reivindicaciones de esta memoria, el singular abarca el plural salvo que el contexto indique otra cosa. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, debe entenderse en la memoria que está incluida la pluralidad así como la singularidad, salvo que el contexto indique otra cosa.

Ha de entenderse que los rasgos, números enteros, características, compuestos, restos o grupos químicos descritos junto con un aspecto, realización o ejemplo particular de la invención son aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en la presente memoria, salvo que sean incompatibles con ellos.

50 A continuación se describirá una realización de la invención sólo como ejemplo y con referencia a los siguientes materiales, métodos y figuras.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra (a) la secuencia de DNA que codifica la región gcp expuesta supuestamente fuera de la membrana; y (b) la totalidad de la secuencia de DNA del polipéptido ortólogo gcp, ambas de *Staphylococcus aureus*.

5 La Figura 2 (a) y (b) muestra las secuencias de aminoácidos correspondientes a las secuencias de DNA mostradas en la Figura 1 (a) y (b), respectivamente.

La Figura 3 muestra el gráfico de la hidropatía de la proteína gcp de la membrana. El cálculo de los gráficos de la hidropatía del gcp antes citado y la representación gráfica correspondiente para predecir el modelo topológico de la transmembrana se determinó de acuerdo con el método ConPredII y se realizó en el servidor <http://bioinfo.si.hirosakiu.ac.jp/~ConPred2/>.

10 Los gráficos de la Figura 4 muestran que el tratamiento térmico de sueros procedentes de un paciente humano (□), de un conejo no inmunizado (○) o de sueros producidos contra la proteína ciclofilina de *A. thaliana* (Δ) no inducía la muerte de *S. aureus* SJF741. No se observó la eliminación de *S. aureus* SJF741 cuando se utilizaron sueros naturales de un paciente convaleciente de una infección por *S. aureus* (■) (Panel A) y de un conejo no inmunizado (●) (Panel B). Cuando se produjeron sueros naturales contra la proteína ciclofilina de *A. thaliana* (▲) (Panel C), contra las proteínas Obg (▼) e YdiB (+) de *B. subtilis* (Panel D) y contra la proteína SA1387 de *S. aureus* (◆) (Panel E) se observó una menor disminución del número de *S. aureus* SJF741 durante las primeras 6 horas, que fue seguida por una recuperación subsiguiente.

20 Los gráficos de la Figura 5 muestran que los sueros naturales producidos contra las proteínas YsxC (●), YphC (■) e YwlC (▲) de *B. subtilis* (Paneles A y B) eliminaron drásticamente *S. aureus* SJF741, una disminución 5 log en 2 a 4 horas. Se observó un efecto similar cuando se usaron sueros naturales producidos contra los péptidos YneS-731 (▼) e YneS 733 (◆) de *S. aureus* y la proteína Gcp (+) de *S. aureus* (Paneles C-E). En contraste, el tratamiento térmico de los sueros producidos contra la proteína YsxC de *B. subtilis* (○) o los péptidos YneS-731 (∇) e YneS-733 (◇) de *S. aureus* (Paneles A, C, D) suprimió las capacidades de eliminación de estos sueros, que eran capaces de eliminar *S. aureus* SJF741 en forma natural (no tratados térmicamente), como se ha indicado antes. Por tanto, las capacidades de eliminación de los sueros son debidas a un componente termolábil, que está inactivado en la muestra tratada térmicamente. En esta figura no se muestra ninguno de los experimentos que usan sueros tratados térmicamente producidos contra las proteínas YphC (■) e YwlC (▲) de *B. subtilis* o contra la proteína gcp de *S. aureus* (+), y los experimentos con los sueros naturales correspondientes (Paneles B y E), como se ha indicado antes, ilustran la capacidad de eliminación de *S. aureus* de estos sueros.

30 Ejemplos

Materiales y métodos

Cepas

35 Los DNA cromosómicos usados para la amplificación por PCR de las secuencias génicas de interés fueron *B. subtilis* subespecie *subtilis* cepa 168, *S. aureus* NCTC 8325, *S. aureus* N315 y *S. aureus* COL (véase la Tabla I para información sobre la localización de las secuencias de DNA). Un derivado de fusión transcripcional *sodA::lacZ* resistente a la eritromicina de *S. aureus* SH1000 (*S. aureus* SJF741), fue la cepa usada en los ensayos (Horsburgh *et al.*, 2002).

Tabla I

Secuencias de DNA, proteínas y péptidos usadas como antígenos

40 Las secuencias génicas y proteínicas de los genes mencionados se pueden encontrar en:

B. subtilis subespecie *subtilis* cepa 168:

<http://genolist.pasteur.fr/SubtilList/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/framik.cgi?db=Genome&gi=27>

45 *S. aureus* 8325 (es una secuencia no anotada; las secuencias anotadas equivalentes de *S. aureus* que contienen los genes de interés se pueden encontrar a continuación): Iandolo *et al.*, 2002; Novick, 1967; University of Oklahoma Norman Campus, Advanced Center for Genome Technology

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/framik.cgi?db=Genome&gi=610>)

Otras cepas de *S. aureus*:

S. aureus subespecie *aureus* cepa N315: Kuroda, 2001;

http://b-yahiko.bio.nite.go.jp/dogan/MicroTop?GENOME_ID=n315G1

<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=ntsa01>

S. aureus subespecie *aureus* cepa COL: The Center for Genomic Research

<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=gsa>

5 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=93062>

NOTA: diferentes cepas de *S. aureus* tienen diferentes nombres de locus para los mismos genes debido a las inserciones de fagos en la secuencia. En este documento, los nombres de los locus usados para los genes de *S. aureus* corresponden a los de la secuencia N315 de *S. aureus*.

Preparación de antígenos

10 Los genes que codifican las proteínas seleccionadas de *B. subtilis* 168 (Obg, YdiB, YphC (Fig. 1), YsxC (Fig. 2), YwlC (Fig. 3)) y de *S. aureus* N315 (SA1387, Gcp/SA1854 (Fig. 6)) fueron amplificados por PCR. Los productos resultantes se clonaron en el plásmido pETBlue-1 y los genes se sobreexpresaron en células de *Escherichia coli* Tuner™(DE3) pLacI Competent (Novagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las proteínas sobreexpresadas se purificaron en un esquema de 3 etapas basadas en cromatografía de intercambio aniónico, hidrófoba y de filtración en gel. El nivel de sobreexpresión de las proteínas fue confirmado por SDS-PAGE y la pureza tenía un valor medio del 90%. Además, los péptidos seleccionados dentro de la proteína SA1187 de *S. aureus* N315 (YneS-731 (Fig. 4) e YneS-733 (Fig. 5)) se sintetizaron en un sintetizador de péptidos Milligen 9050 usando química de Fmoc. Los Fmoc-aminoácidos (Novobiochem/Merck) se activaron inmediatamente antes del acoplamiento usando cantidades equimolares de HCTU o HBTU en presencia de un exceso molar del 10% de HOBt. En ambos casos, se incorporó una cisteína en el extremo C del péptido para permitir la unión a la proteína transportadora ensamblando el péptido en la resina Fmoc-L-Cys(Trt)-PEG-PS (Applied Biosystems). Los péptidos se purificaron usando una columna C18 Vydac (22x250 mm) empleando gradientes de acetonitrilo en TFA al 0,1%. Los péptidos se verificaron por espectrometría de masas. Los péptidos purificados se conjugaron con KLH (Sigma) (proteína transportadora) para potenciar la inmunogenicidad del hapteno en el conejo. La conjugación se realizó 10x en PBS usando MBS (Sigma).

Sueros

30 Los sueros se obtuvieron del Antibody Resource Center en la University of Sheffield de: i) conejos inmunizados frente a proteínas de *B. subtilis* (Obg, YdiB, YphC, YwlC e YsxC) y de *S. aureus* (Gcp, SA1387); ii) conejos inmunizados frente a péptidos conjugados con KLH seleccionados de la proteína SA1187 de *S. aureus* (YneS-731, YneS-733); iii) conejos inmunizados frente a un péptido conjugado con KLH de la proteína ciclofilina de *Arabidopsis thaliana*; iv) suero de conejo no inmunizado; y v) suero humano de un paciente convaleciente de una infección por *S. aureus*.

35 El proceso de inmunización se realizó como sigue. Para cada conejo, se mezclaron 200 a 500 µg de antígeno (en un volumen máximo de 250 µL de solución salina tamponada con fosfato (PBS)) con un volumen igual de adyuvante completo de Freund. La solución se filtró por una aguja de 23G hasta que se formó una emulsión que no se separó en reposo. Se inoculó cada conejo con un máximo de 500 µL por vía subcutánea. Se repitió la inyección los días 22, 43 y 64 pero usando adyuvante incompleto de Freund. Se tomaron muestras de sangre el día 53 y después del día 64. Las fechas de las inyecciones fueron flexibles en un intervalo de 3 a 6 semanas. Cuando se detecta un título adecuado en el ensayo del suero, se puede planificar una inyección de recuerdo seguida de la extracción de sangre 40 10 días más tarde.

Los sueros se conservaron congelados, descongelándose y filtrándose por filtros con un diámetro de poro de 0,2 µm (Minisart High Flow, Sartorius) inmediatamente antes de su uso en los experimento de eliminación.

45 Realizando análisis de transferencia de Western (datos no mostrados) se demostró que los anticuerpos contra *B. subtilis* YdiB reconocen una banda del tamaño correspondiente al del homólogo del YdiB en *S. aureus*, lo que sugiere la reactividad cruzada entre especies de estos anticuerpos.

Medios y condiciones de crecimiento

Para preparar el inóculo para los experimentos de los sueros, se cultivó *S. aureus* SJF741 a 37°C en medio de infusión de cerebro-corazón (BHI; Oxoid) suplementado con eritromicina (Sigma) hasta una concentración final de 5 µg/mL (BHI-Ery).

50 Preparación del inóculo

Una sola colonia de *S. aureus* SJF741 recién cultivada sobre placas de BHI-Ery de la disolución madre congelada de laboratorio se inoculó en frascos universales de 30 mL que contenían 5 mL de BHI-Ery y se incubaron durante una noche (entre 12 y 16 horas) a 37°C en un agitador orbital (250 rpm). Inmediatamente antes de la inoculación en el

siero se preparó una dilución 10 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) del cultivo resultante.

Experimentos en sueros

Partes alícuotas de 200 μL de los diversos sueros en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL se inocularon con la dilución en PBS de *S. aureus* SJF741 (véase Preparación del inóculo) hasta una densidad de células final desde 1×10^6 hasta 1×10^7 células/mL, seguido por incubación en un agitador rotatorio a 37°C. Periódicamente se tomaron muestras de 10 μL de estos cultivos de sueros, se diluyeron en serie y 10 μL de cada dilución se colocaron sobre placas con BHI-Ery, que se incubaron subsiguientemente a 37°C durante una noche. Además, sobre placas con BHI-Ery se extendió directamente otra muestra de 10 μL de cada cultivo de suero. Sólo se enumeraron las diluciones que producían de 10 a 40 colonias y se determinó el número de células viables (unidades formadoras de colonias, UFC) por mL.

Resultados

Para evaluar las capacidades de eliminación de estafilococos de los diversos sueros, se inoculó *S. aureus* con los diversos anti-sueros de conejo y se evaluó la supervivencia con el tiempo. Los resultados mostraron que *S. aureus* era drásticamente eliminada al cabo de 2 a 3 horas de contacto con los sueros (Fig. 16) que contenían anticuerpos contra Gcp e YneS, así como otras proteínas de superficie. En contraste, los anticuerpos contra las proteínas citoplásmicas de *B. subtilis* (Obg e YdiB), contra una proteína de membrana de *Arabidopsis thaliana* (ciclofilina) y contra diversos sueros de conejos normales no mostraron el fenotipo bactericida (Fig. 15). Sorprendentemente, los sueros de conejos inmunizados frente a otras supuestas proteínas citoplásmicas de *B. subtilis* (YsxC, YphC e YwIC) revelaron también un fenotipo eliminador similar al observado para los anticuerpos Gcp e YneS (731 y 733). Esto era inesperado puesto que YsxC, YphC e YwIC son supuestas proteínas citoplásmicas y, por consiguiente, no están expuestas en la superficie y por tanto no se esperaba que los antisueros las reconocieran.

Este trabajo sugiere la localización de YsxC en la fracción de membrana de *S. aureus*. Este trabajo ha demostrado además que el efecto eliminador está mediado por un componente termolábil (inactivado por tratamiento térmico, véase Material y métodos) presente en el suero, probablemente que corresponde con algunos de los componentes del complemento (Fig. 16).

Referencias

- Horsburgh *et al.*, *J. Bacteriol.* 184(9):5457-67 (2002).
- Iandolo *et al.*, *Gene* 289, 109-118 (2002).
- Ikeda *et al.*, *In Silico Biol.*, **2**, 19-33 (2002).
- Ikeda *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 406-409 (2003).
- Karavolos *et al.*, *Microbiology Oct*; 149(Pt 10):2749-58 (2003).
- Kobayashi *et al.*, *Mol Microbiol. Sep*; 41(5):1037-51 (2001).
- Kobayashi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(8):4678-83 (2003).
- Kunst *et al.*, *Nature Nov 20*;390(6657):249-56 (1997).
- Kuroda, M., *et al.*, *Lancet.* 357:1225-1240 (2001).
- Lao and Shimizu In Valafar, F. (ed.), *Proceedings of the 2001 International Conference on Mathematics and Engineering Techniques in Medicine and Biological Sciences (METMBS'01)*, CSREA Press, USA, pp. 119-125 (2001).
- Lao *et al.*, *Bioinformatics*, **18**, 562-566 (2002).
- Lao, D. M., Okuno, T. and Shimizu, T. 2002. *In Silico Biol.*, **2**, 485-494.
- Moszer I., Jones L. M., Moreira S., Fabry C., Danchin A., 2002. *Nucleic Acids Res.* 30(1):62-5.
- Novick, R. P. 1967. *Virology* 33:155-156.
- Xia, J. -X., Ikeda, M. and Shimizu, T. 2004 *Comput. Biol. Chem.*, **28**, 51-60.
- Zalacain M., *et al.*, 2003. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 6(2):109-26.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido antigénico codificado por una secuencia aislada de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en:
- i) una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de nucleótidos de la Figura 1a;
 - 5 ii) una secuencia de ácidos nucleicos que está degenerada como resultado del código genético a la secuencia de ácidos nucleicos definida en (i) anterior y que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la Figura 2a; y
 - iii) una molécula de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la Figura 2a.
- 10 2. Un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido antigénico de acuerdo con la reivindicación 1, y uno o más marcadores seleccionables.
3. Una vacuna que comprende un polipéptido antigénico de acuerdo con la reivindicación 1, y que comprende además un vehículo y/o un adyuvante.
- 15 4. Un anticuerpo terapéutico, o al menos una de sus partes para una unión eficaz, que se une a un polipéptido antigénico de acuerdo con la reivindicación 1.
5. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
6. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que comprende la región variable de dicho anticuerpo con una región invariable o constante de un anticuerpo humano.
- 20 7. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo se humaniza por métodos recombinantes de modo que se combinen las regiones determinantes de la complementariedad de dicho anticuerpo tanto con las regiones constantes (C) como con las regiones de armazón de las regiones variables (V) de un anticuerpo humano.
- 25 8. Un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un anticuerpo terapéutico quimérico de acuerdo con la reivindicación 7 o un anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 7, y uno o más marcadores seleccionables.
9. Una célula o línea celular transformada o transfectada que comprende el vector de la reivindicación 2 u 8.
- 30 10. Un polipéptido antigénico de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento o profilaxis de una infección microbiana.
11. El polipéptido antigénico para uso en el tratamiento o profilaxis de una infección microbiana de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la infección microbiana es una infección bacteriana provocada por un patógeno bacteriano procedente de una especie bacteriana seleccionada del grupo que consiste en: *Staphylococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* spp, *Enterococcus faecalis*, *Lysteria* spp, *Pseudomonas* spp, *Mycobacterium* spp, *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterobacter* spp, *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp, *Streptococcus* spp, *Streptococcus* del grupo A o B, *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter* spp, *Helicobacter pylori*, *Neisseria* spp, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Borrelia burgdorferi* spp, *Shigella* spp, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Haemophilus* spp, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia* spp, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Francisella tularensis*, *Bacillus* spp, *Bacillus anthracis*, *Clostridia* spp, *Clostridium botulinum*, *Yersinia* spp, *Yersinia pestis*, *Treponema* spp, *Burkholderia* spp, *Burkholderia mallei* y *B. pseudomallei*.
- 40 12. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, para uso en el tratamiento de una infección por *Staphylococcus aureus*.

Fig 1

(a)

atgactaaagatatattaactagctgttgaacaagttgtgatgaaacaagcgttagt
ggtataaaaaatggcagagatatttatcaaatacagtttaagtacagattgaaagtc
aaacgatttggcgggtgctggtccgaagtggcaagtagacatcacgttgaaggataaca
acaacaataaacgaggctctagtgatgccgatgtatcaatggaagatattgatgccata
gctggttaca

(b)

atgactaaagatatattaactagctgttgaacaagttgtgatgaaacaagcgttagt
ggtataaaaaatggcagagatatttatcaaatacagtttaagtacagattgaaagtc
aaacgatttggcgggtgctggtccgaagtggcaagtagacatcacgttgaaggataaca
acaacaataaacgaggctctagtgatgccgatgtatcaatggaagatattgatgccata
gctggttacagaaggccctggactaattggtgctgactaatagggtgtaaatgcagccaaa
gcattggcattgcttacgataagccacttattcctgttcatcatattgcaggacatata
tatgctaatacatagaagagccattaacattcccgttaattgcacttattgttcaggt
ggacatactgaattagttatgaaagatcatttatcattgaagtcattggtgaaaca
cgagatgacgcagtaggtgaggcttatgataaagtggcacgaacaattggtttaaattat
ccaggtggtccacaagttgatcgggtgctgctgaaggtgaagatacttattcattcct
cgtgtttggttgataaagatagttatgattttagtttagtgggtgaaaagtgccgtg
atcaatcaacttcacaatcaacgacaaaaaataattccaatcattgaagctaactgtagca
acgagcttcaaaatagtggttagaggtgcttacgtttaaagctattcaagcttgtaa
gaatatagtgttcagcgattaattgttgctggtggcgtggcgagtaataaaggattacgt
caatcttagcggatcaatgcaaagtcaatgacattcaattaactatcccaagtcctaaa
ttatgcacagataatgctgcaatgataggcgttgccggccactctttgatcagcaaggt
cgatttgctgatttagcattaaatgggcacagcaatatagattagaagagtattctgca
gaataa

Fig. 2

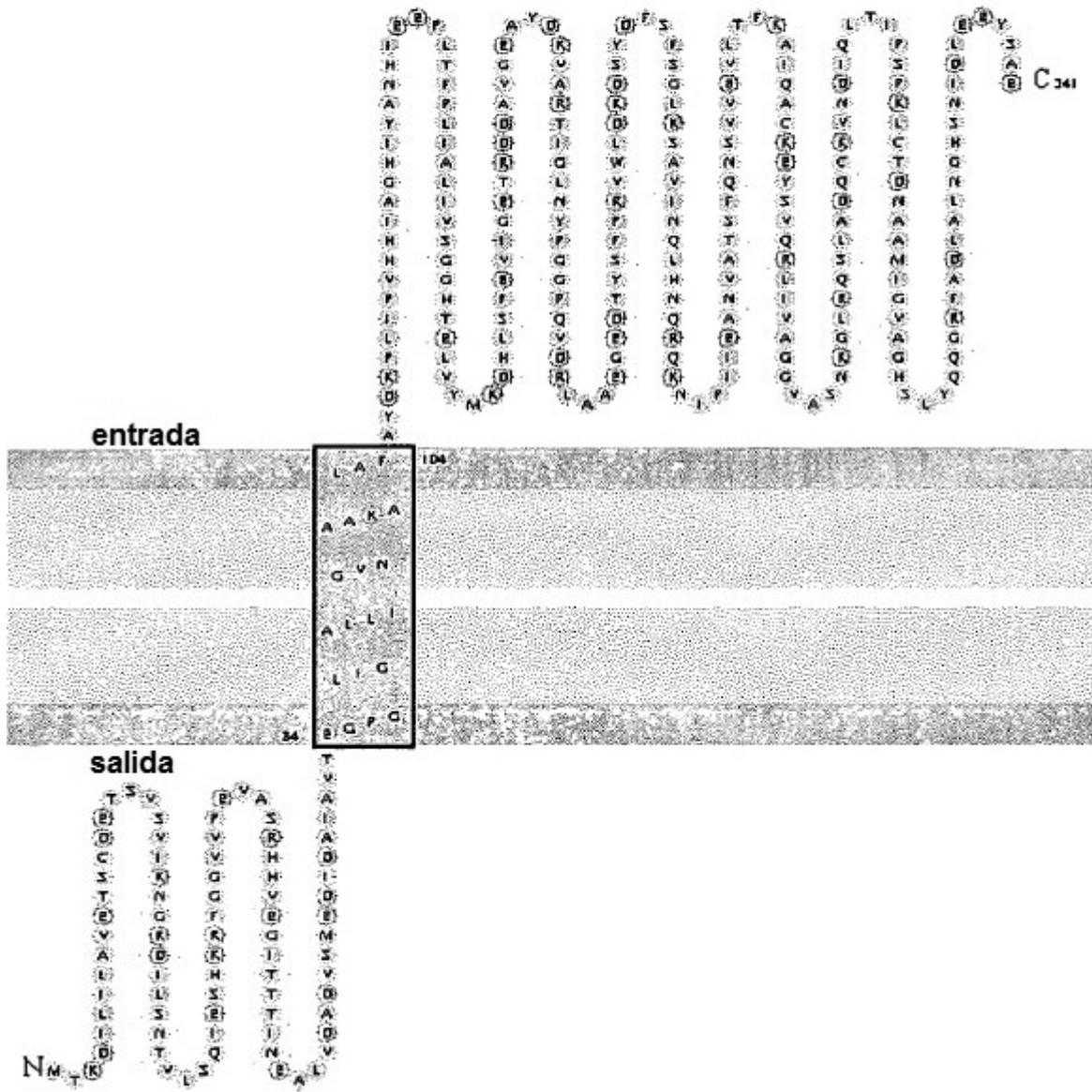
(a)

MTKDILILAVETSCDETSVSVIKNGRDILSNTVLSQIESHKRFGGVVPEVASRHHV
EGITTTINEALVDADVSMEDIDAIAVT

(b)

MTKDILILAVETSCDETSVSVIKNGRDILSNTVLSQIESHKRFGGVVPEVASRHHVEGIT
TTINEALVDADVSMEDIDAIAVTEGPGLIGALLIGVNAAKALAFAYDKPLIPVHHIAGHI
YANHIEEPLTFPLIALIVSGGHTELVYMKDHLSFEVIGETRDDAVGEAYDKVARTIGLNY
PGGPQVDRLAAEGEDTYSFPRVWLDKDSYDFSGLKSAVINQLHNQRQKNIPHEANVA
TSFQNSVVEVLTFKAIQACKEYSVQRLIVAGGVASNKGLRQSLADQCKVNDIQLTIPSPK
LCTDNAAMIGVAGHSLYQQGRFADLALNGHSNIDLEEYSAE

Fig 3



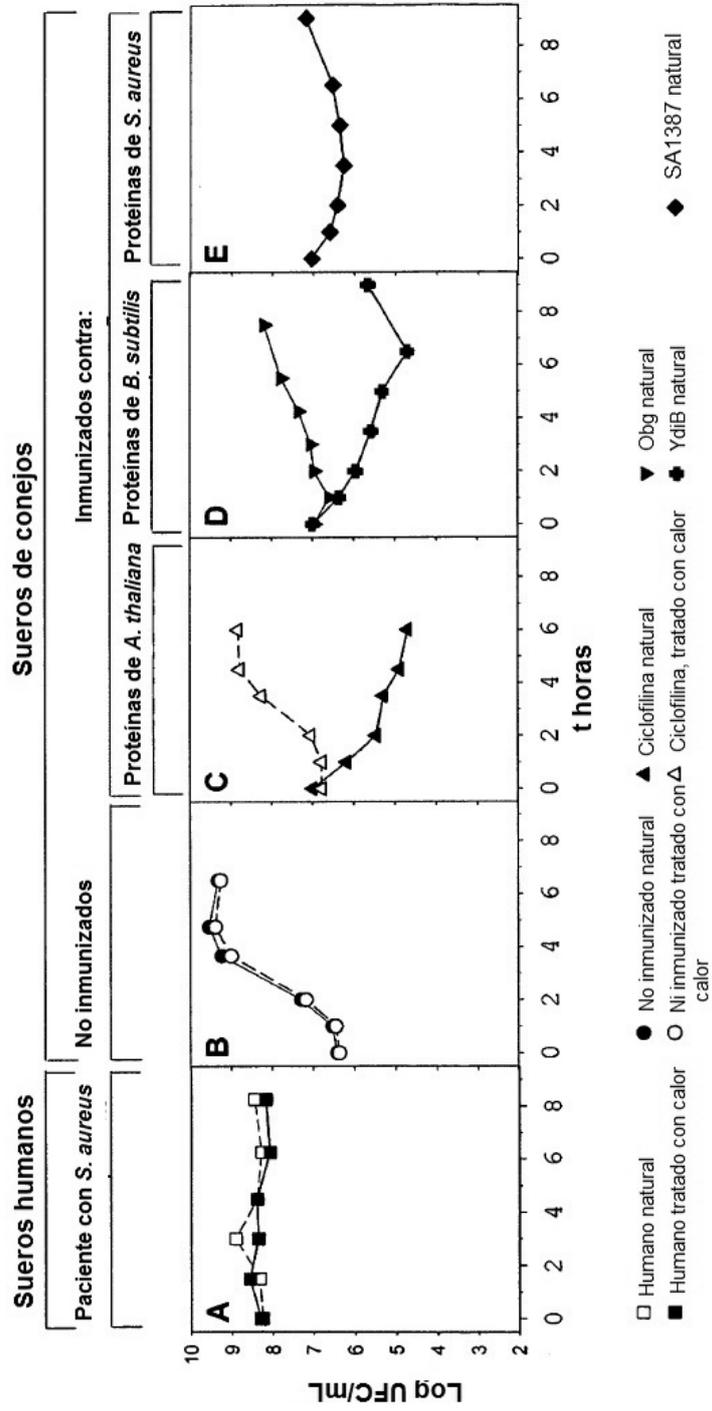


Fig. 4.

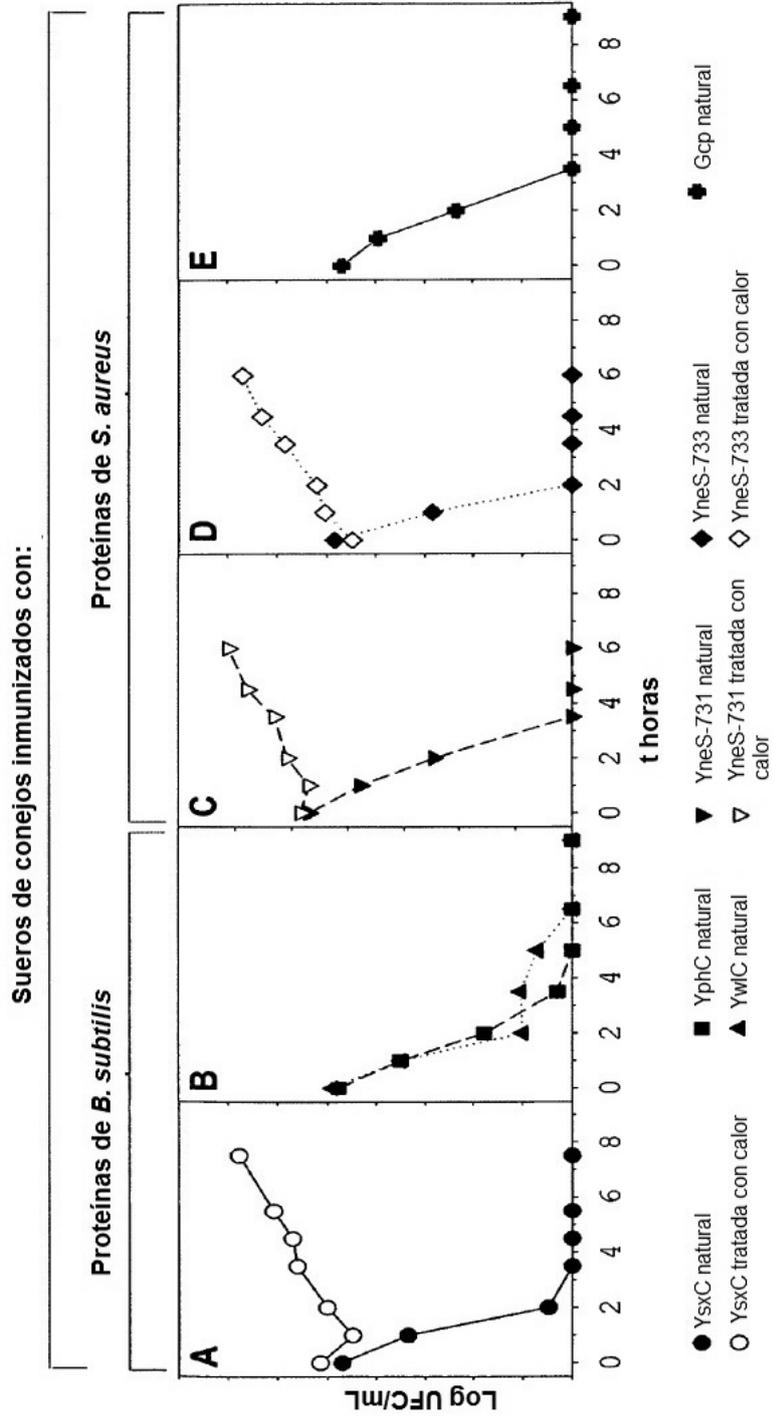


Fig. 5.