

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 437**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2010** **E 10720416 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015** **EP 2432804**

54 Título: **Anticuerpos o fragmentos de éstos dirigidos contra un epítopo del Staphylococcus aureus de IsaA o IsaB**

30 Prioridad:

18.05.2009 US 179133 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.06.2015

73 Titular/es:

**JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
WÜRZBURG (100.0%)
Sanderring 2
97070 Würzburg, DE**

72 Inventor/es:

**OHLSSEN, KNUT y
LORENZ, UDO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 537 437 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

Anticuerpos o fragmentos de éstos dirigidos contra un epítipo del *Staphylococcus aureus* de IsaA o IsaB

- 5 Esta invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de éstos que son dirigidos contra un epítipo de *Staphylococcus aureus* (= *S. aureus*), a un kit que contiene estos anticuerpos o fragmentos, a un uso de estos anticuerpos o fragmentos, a una línea celular de hibridoma que produce estos anticuerpos y a un método de tratamiento.
- 10 De FEMS Immunol. Med. Microbial. 2000 Oct.; 29(2), páginas 145 a 153 se conocen las estructuras inmunodominantes que fueron expresadas *in vivo* durante una septicemia causada por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Estas estructuras son la proteína de 29 kDa IsaA y la proteína de 17 kDa IsaB. Se afirma que estas proteínas pueden servir como posibles blancos para el desarrollo de una terapia contra SARM basada en anticuerpos.
- 15 Del resumen "Development of antibody-based therapy targeting immunodominant antigens of *Staphylococcus aureus*", Ohlsen, K. et al., página 128 del libro de resúmenes publicado para la 59ª conferencia anual de la Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. en septiembre de 2007 y de Lorenz, U. et al., "Therapeutische Effektivität von monoklonalen Antikörpern gegen *Staphylococcus aureus* in einem Septicemia- und Abszess-Mausmodell", Chirurgisches Forum 2008, Springer Berlin Heidelberg, 29 de mayo de 2008, edición 17, pp. 225-226 se conoce la aplicación de un primer anticuerpo monoclonal murino dirigido al antígeno inmunodominante IsaA en dos modelos de infección animal. El estudio reveló que la aplicación de MAB anti-IsaA reduce la carga de la infección en ambos modelos de infección.
- 20 El objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos anticuerpos o fragmentos de éstos que sean adecuados para un tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* y para la detección de *S. aureus*. Además, se deberá proporcionar un kit que contenga estos anticuerpos o fragmentos de éstos, un uso de estos anticuerpos o fragmentos, una línea celular de hibridoma que segregue estos anticuerpos o fragmentos y un método de tratamiento.
- 25 Este objetivo es resuelto por el contenido de las reivindicaciones 1, 8, 15, 16, 17 y 19. Las realizaciones de la invención se dan a conocer en las reivindicaciones 2 a 7, 9 a 14, 18 y 20 a 24.
- 30 De acuerdo con la invención se proporcionan anticuerpos o fragmentos de éstos, donde dichos anticuerpos o fragmentos son dirigidos contra un epítipo del *Staphylococcus aureus* que es reconocido por otros anticuerpos monoclonales que son segregados por la línea celular de hibridoma depositada en el "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania" (DSMZ) con el número de registro DSM ACC2987, donde el epítipo contiene al menos una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 13 aminoácidos a una de las secuencias SEQ ID NO: 15, 17 a 19, 21 a 26, 32 a 34 y 57
- 35 o donde cada uno de los anticuerpos tiene una cadena pesada con una primera región variable y una cadena ligera con una segunda región variable, donde la primera región variable contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 2 y donde la segunda región variable contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 4. La línea celular de hibridoma depositada en el DSMZ con el número de registro DSM ACC2987 se denomina además "línea celular DSM ACC2987". Los otros anticuerpos monoclonales que son segregados por la línea celular DSM ACC2987 son anticuerpos monoclonales de ratón.
- 40 Los anticuerpos según la invención consisten en moléculas de inmunoglobulina completas, preferentemente IgM, IgD, IgE, IgA o IgG, más preferentemente IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 o IgG4, mientras que los fragmentos consisten en partes de dichas moléculas de inmunoglobulina, como fragmentos Fab o regiones V, VH o CDR. Además, los anticuerpos consisten en anticuerpos modificados o alterados, como anticuerpos quiméricos y humanizados. Los anticuerpos también consisten en anticuerpos monoclonales o policlonales modificados o alterados, así como anticuerpos generados por vía recombinante o sintética, o sintetizados. Los fragmentos consisten en fragmentos de los anticuerpos así como en partes de éstos, por ejemplo, cadenas ligera y pesada separadas, Fab, Fab/c, Fv, Fab', F(ab')₂. Los anticuerpos según la invención también incluyen derivados de anticuerpos como anticuerpos bifuncionales y constructos de anticuerpos, como Fv monocatenarios (scFv), scFv biespecíficos o anticuerpo-proteínas de fusión. Todos los derivados de anticuerpos tienen la especificidad de unión de los anticuerpos de los cuales derivan, es decir, son dirigidos contra un epítipo del *Staphylococcus aureus* que es reconocido por los otros anticuerpos monoclonales segregados por la línea celular de hibridoma DSM ACC2987.
- 45 50 55 60

El epítipo que es reconocido por los otros anticuerpos monoclonales que son segregados por la línea celular DSM ACC2987 está ubicado en el antígeno inmunodominante IsaA del *S. aureus*. Los inventores de la presente invención encontraron que el epítipo reconocido por los anticuerpos de acuerdo con la invención está particularmente

expuesto en el *S. aureus*. Los anticuerpos o fragmentos que son dirigidos contra este epítipo son adecuados para la detección de *S. aureus* y para el tratamiento de una infección con *S. aureus*. Debido a la alta variabilidad del *S. aureus* que causa diferentes magnitudes de expresión y mutaciones de los antígenos en diferentes cepas, cada anticuerpo que reconoce un epítipo adicional no reconocido por otros anticuerpos es útil para la detección de *S. aureus*, así como para el tratamiento de una infección por *S. aureus*.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales. En particular los anticuerpos pueden ser los otros anticuerpos monoclonales, es decir, los anticuerpos que son segregados por la línea celular de hibridoma, DSM ACC2987. Estos anticuerpos son muy útiles para la detección de *S. aureus*, así como para el tratamiento de una infección. Tienen muy altas afinidades y especificidades. La alta afinidad de los anticuerpos que son segregados por la línea celular de hibridoma DSM ACC2987 por el epítipo reconocido por estos anticuerpos, se indica por un bajo valor de K_D para la unión de dicho anticuerpo a dicho epítipo. Dependiendo del método de determinación se han determinado valores de K_D de ≤ 18 pM y 1.7 nM para esta unión (véanse Figs. 6 y 7 y el texto correspondiente).

Los anticuerpos monoclonales o los anticuerpos que son segregados por la línea celular de hibridoma DSM ACC2987 pueden ser anticuerpos del tipo IgG, en particular, el tipo IgG1 o IgG2b. Los fragmentos pueden ser fragmentos Fab, fragmentos Fab/c, Fragmentos Fv, fragmentos Fab' fragmentos o fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos son particularmente útiles para la detección de *S. aureus* porque la pared celular del *S. aureus* contiene proteína A que se une inespecíficamente a inmunoglobulinas a través de sus partes Fc.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos animales, es decir, anticuerpos producidos en un animal, especialmente anticuerpos murinos, bovinos o de camélidos, anticuerpos humanos, anticuerpos producidos en una planta, un huevo o un hongo, en particular un *Saccharomyces*, anticuerpos recombinados producidos en las células de una línea celular, anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados. Un anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo monoclonal que contenga la porción de unión de un anticuerpo monoclonal de ratón, por ejemplo el anticuerpo monoclonal segregado por la línea celular de hibridoma DSM ACC2987 y la porción que no se une de un anticuerpo humano.

Cada uno de los anticuerpos puede tener una cadena pesada con una primera región variable y una cadena ligera con una segunda región variable, donde la primera región variable contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 92.5% idéntica, en particular al menos 95% idéntica, en particular al menos 97.5% idéntica, en particular 100% idéntica, a la secuencia SEQ ID NO: 2 y donde la segunda región variable contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 92.5% idéntica, en particular al menos 95% idéntica, en particular al menos 97.5% idéntica, en particular 100% idéntica, a la secuencia SEQ ID NO: 4.

La primera región variable y la segunda región variable según se caracterizaron antes forman juntas un sitio de unión que tiene alta afinidad y especificidad por el epítipo.

Una posible secuencia de ADN que codifica la primera región variable según SEQ ID NO: 2 es la secuencia SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 1 es la secuencia que codifica la primera región variable de los anticuerpos segregados por la línea celular DSM ACC2987. La segunda región variable según SEQ ID NO: 4 puede ser codificada por la secuencia SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 3 es la secuencia que codifica la segunda región variable de los anticuerpos segregados por la línea celular DSM ACC2987.

El epítipo ubicado en el antígeno inmunodominante IsaA de *S. aureus*, puede contener al menos una secuencia de aminoácidos que sea idéntica en al menos 14, en particular en 15, aminoácidos a una de las secuencias SEQ ID NO: 15, 17 a 19, 21 a 26, 32 a 34 y 57 según el listado de secuencias.

El mapeo de epítipos reveló que las secuencias SEQ ID NO: 15, 17 a 19, 21 a 26, 32 a 34 y 57 están implicadas en la unión de los anticuerpos o fragmentos de éstos al epítipo. El epítipo puede contener más de una secuencia de aminoácidos según se especificó antes. El epítipo puede incluso estar formado por dos o más secuencias ubicadas separadas una de otra en la secuencia de aminoácidos de IsaA.

Los anticuerpos o fragmentos según la invención se pueden usar como un medicamento. Especialmente se pueden utilizar como un medicamento para el tratamiento de un ser humano o un animal donde el ser humano o el animal tiene una infección por *S. aureus*, especialmente *S. aureus* resistente a la metilicina o sensible a la metilicina, o corre riesgo de contraer dicha infección. El ser humano o el animal puede tener una mastitis o una septicemia causada por la infección. La mastitis puede ser una mastitis bovina. Si una vaca tiene mastitis bovina la leche producida por la misma no puede ser utilizada y si la vaca se trata con antibióticos, como es habitual en este caso, la leche producida por esta vaca debe ser desechada hasta la leche no contenga antibióticos. Esta desventaja del tratamiento habitual puede ser evitada mediante el uso de anticuerpos o fragmentos según la invención como un medicamento para el tratamiento de la mastitis bovina.

El medicamento puede ser un medicamento que se prepare para el uso sistémico y/o la aplicación local. Los inventores se han dado cuenta de que el tratamiento de una infección grave por *S. aureus* con los anticuerpos o fragmentos según la invención resulta en una reducción significativa de las tasas de mortalidad y del número de *S. aureus* en los órganos del ser humano o el animal tratado. Además, los inventores se han dado cuenta de que la muerte por fagocitosis de la bacteria *S. aureus* por los leucocitos polimorfonucleares aumenta significativamente si los anticuerpos según la invención están unidos a la bacteria *S. aureus* en comparación con la bacteria *S. aureus* sin estos anticuerpos.

Los anticuerpos o fragmentos pueden estar presentes en una mezcla con otros anticuerpos o fragmentos de estos otros anticuerpos donde esos otros anticuerpos son dirigidos contra al menos otro epítipo del *Staphylococcus aureus*. Este otro epítipo puede estar ubicado en el antígeno en el que está ubicado el epítipo, es decir, IsaA, o en otro antígeno. El uso de una mezcla de ese tipo como medicamento, puede ser más eficaz que el uso de un medicamento que contenga solamente los anticuerpos o fragmentos según la invención. Esto puede deberse a la alta variabilidad del *S. aureus* que causa diferentes magnitudes de expresión de los antígenos en diferentes cepas, de modo que más bacterias son reconocidas por la mezcla de anticuerpos o fragmentos que por los anticuerpos o fragmentos solos.

Los anticuerpos o fragmentos pueden estar presentes en una mezcla con al menos un antibiótico. En el ser humano o animal a ser tratado con el medicamento puede haber presente *S. aureus* mutado además del *S. aureus* común. El *S. aureus* mutado puede tener IsaA mutado que no puede ser reconocido por los anticuerpos o fragmentos según la invención. En este caso el antibiótico puede ser eficaz contra el *S. aureus* mutado.

Los anticuerpos o fragmentos según la invención pueden estar presentes en una mezcla con plasma sanguíneo de un mamífero, especialmente con plasma sanguíneo de un ser humano. Los inventores encontraron, que los anticuerpos o fragmentos según la invención mezclados con plasma pueden ser mucho más eficaces que los anticuerpos o fragmentos según la invención contenidos en una solución salina.

La invención también se refiere a un kit que contiene anticuerpos o fragmentos según la invención para la detección de *S. aureus*. Dicho kit se puede usar con fines diagnósticos.

La invención se refiere además al uso de anticuerpos o fragmentos según la invención para la detección, especialmente una detección altamente específica, de *S. aureus*.

Por otra parte, la invención se refiere a una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos según la invención. La línea celular de hibridoma puede ser la línea celular depositada en el DSMZ con el número de referencia DSM ACC2987.

La invención se refiere además a un método de tratamiento de un ser humano o un animal en el que el ser humano o el animal tiene una infección por *Staphylococcus aureus*, especialmente *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina o sensible a la metilicina, o corre riesgo de contraer dicha infección, en el cual se administran anticuerpos o fragmentos según la invención al ser humano o el animal. Los anticuerpos o fragmentos se administran en una dosis que es suficiente para reducir la cantidad de *S. aureus* o causar una eliminación del *S. aureus* en el ser humano o el animal. Los anticuerpos o fragmentos se pueden mezclar con un portador adecuado.

El ser humano o el animal puede tener una mastitis o una septicemia causada por la infección. Los anticuerpos o fragmentos pueden estar presentes en una mezcla con otros anticuerpos o fragmentos de estos otros anticuerpos donde esos otros anticuerpos son dirigidos contra al menos otro epítipo del *Staphylococcus aureus*. Además, los anticuerpos o fragmentos se pueden mezclar con plasma o sangre de un mamífero, especialmente un ser humano, antes de ser administrados. Los anticuerpos o fragmentos se pueden administrar sistémicamente, en particular por vía intravenosa, nasal o sublingual. También se pueden administrar junto con al menos un antibiótico.

Realizaciones de la invención.

Las figuras 1a, 1b y 1c muestran tinciones de inmunofluorescencia de la cepa de *S. aureus* MA12 (Fig. 1a), de la cepa de *S. aureus* con IsaA inactiva MA12 Δ isaA (Fig. 1b) y de la cepa de *S. aureus* con la proteína A inactiva Cowan I Δ spsA::Tcr (Fig. 1c), con los anticuerpos según la invención.

La figura 2 muestra los datos de ELISA de la unión a IsaA de MAB-IsaA29 clon 215 de en comparación con MAB-UK-66.

La figura 3 muestra la supervivencia de los ratones después de la provocación i.v. con la cepa de *S. aureus* USA300 y el tratamiento i.v. con anticuerpos monoclonales según la invención o anticuerpos de control del isotipo.

La figura 4 muestra la recuperación de *S. aureus*, cepa MA12 de un catéter venoso central y los órganos de ratones tratados con *S. aureus* y anticuerpos monoclonales según la invención.

La figura 5 muestra la fagocitosis de *S. aureus* por los leucocitos polimorfonucleares en presencia y ausencia de anticuerpos según la invención.

La figura 6 muestra la cinética de la unión de los anticuerpos monoclonales MAB-UK-66 a IsaA inmovilizado.

La figura 7 muestra la cinética de la unión de IsaA a anticuerpos monoclonales MAB-UK-66 inmovilizados.

Las figuras 1a - 1c muestran el resultado de tinciones con anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítomos de IsaA como anticuerpos primarios que fueron producidos por la línea celular de hibridoma DSM ACC2987 y que son denominados como MAB-UK-66. Se usaron anticuerpos conjugados a FITC dirigidos contra IgG de ratón como anticuerpos secundarios.

Las figuras 1a y 1c muestran tinciones de inmunofluorescencia positiva de *S. aureus*, cepas MA12 y Cowan I $\Delta spa::Tc^r$ mientras que la figura 1b no muestra tinción de inmunofluorescencia de *S. aureus*, cepa MA12 $\Delta isaA$. En contraste con la bacteria *S. aureus* natural, las bacterias de la cepa de *S. aureus* Cowan $\Delta spa::Tc^r$ no producen proteína A. La proteína A tiene una alta afinidad por la parte Fc de los anticuerpos. La presencia de proteína A en la bacteria se traduciría en una fuerte unión inespecífica de los anticuerpos primarios y secundarios a la bacteria. La cepa Cowan I $\Delta spa::Tc^r$ se une a los anticuerpos primarios lo que indica la presencia de IsaA pero ninguna reactividad cruzada del anticuerpo con la proteína A.

La figura 2 muestra el resultado de un ensayo de adsorción (ELISA) que se realizó para comparar la unión de IsaA de un anticuerpo monoclonal conocido MAB-IsaA29 clon 215 con la de MAB-UK-66. MAB-IsaA29 clon 215 es el anticuerpo monoclonal descrito en los resúmenes "Development of antibody-based therapy targeting immunodominant antigens of *Staphylococcus aureus*", Ohlsen, K. et al., página 128 del libro de resúmenes publicado para la 59ª conferencia anual de la Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. en septiembre de 2007 y Lorenz, U. et al., "Therapeutische Effektivität von monoklonalen Antikörpern gegen *Staphylococcus aureus* in einem Septicemia- und Abszess-Mausmodell", Chirurgisches Forum 2008, Springer Berlin Heidelberg, 29 de mayo de 2008, edición 17, pp. 225-226. El ELISA se realizó de la manera siguiente:

Después de recubrir durante la noche cada pocillo de una placa de microtitulación con una muestra de 100 μ l de IsaA-proteína recombinante (rlsaA) a una concentración de 0.5 μ g/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7.4) los pocillos se bloquearon con soroalbúmina bovina al 1% durante 2 h. Los anticuerpos anti-IsaA mencionados antes se diluyeron en una proporción de 1 a 4000 y se agregaron a los pocillos. Después de incubar durante 1 h se agregó anti-IgG de ratón en conejo conjugado a peroxidasa de rábano (DAKO, Glostrup, Dinamarca) y se incubó durante 1 h. Después se agregó sustrato ABTS [2, 2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolinosulfónico)] (Sigma Chemical Co., Deisenhofen, Alemania) y se incubó durante 1 h. Se detectó absorbancia a 405 nm usando un lector automático de microplacas. Como se puede ver en la figura 1 la unión de MAB-UK-66 a rlsaA es mucho más intensa que la unión del anticuerpo conocido MAB-IsaA29 clon 215 a rlsaA.

La inmunoterapia anti-*S. aureus* eficaz debería proteger a los ratones contra una provocación letal de *S. aureus*. Para investigar la eficacia *in vivo* de los anticuerpos según la invención se estableció un modelo de supervivencia a septicemia por *S. aureus* en ratones, de la manera siguiente:

Ratones NMRI (Charles River, Sulzfeld, Alemania) emparejados por edad y género fueron provocados en el día 0 por inyección intravenosa con 5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. aureus* USA300 (ATCC N° BAA-1556). Los ratones tratados por vía intravenosa recibieron MAB-UK-66 o anticuerpo emparejado por isotipo como control (régimen de doble dosis: 15 mg/kg en un volumen de 100 μ l de PBS, pH 7.4 inmediatamente y 24 h después de la provocación bacteriana). Los animales fueron controlados durante 8 días, y se registró la dosis letal. La significación de la protección se midió con la prueba de Log-Rank (logaritmo del rango)/Mantel-Cox: $P = 0.022$. El resultado se muestra en la figura 3.

Para la investigación adicional de la eficacia *in vivo* de los anticuerpos según la invención se estableció un modelo, relacionado con catéter, de septicemia por *S. aureus* en ratones de la manera siguiente: se usaron en el experimento ratones NMRI (Charles River Wiga Deutschland GmbH, 97633 Sulzfeld, Alemania) emparejados por edad, género y peso. Los ratones se anestesiaron por vía intraperitoneal con xilazina (8 mg/kg de peso corporal)/ketamina (100 mg/kg de peso corporal) y se les practicó una incisión cutánea horizontal mínima en el lado izquierdo del cuello afeitado. Empleando un microscopio (Carl Zeiss Jena GmbH, 07745 Jena, Alemania) operando con un aumento de 10 - 16 x, se aisló la glándula submaxilar para exponer la bifurcación de la vena facial anterior y posterior. Se realizó una venotomía entre ligaduras flojas en la vena facial anterior aislada. Se introdujo un catéter de polietileno estéril de una sola luz (diámetro interno 0.28 mm x diámetro externo 0.6 mm) a través de la incisión y se

hizo avanzar hacia la vena cava superior. Se ataron las ligaduras y el catéter se introdujo formando un túnel por vía subcutánea y se exteriorizó a través de la incisión de la línea media escapular. Se evaluó la permeabilidad, el catéter se llenó con solución de heparina, se selló con un tapón y se dejó en el lugar durante todo el experimento. Veinticuatro horas después de la cirugía, los ratones se inocularon a través del catéter con 100 μ l de una suspensión de *S. aureus*, que contenía 1×10^7 ufc de bacteria *S. aureus*, cepa MA12. MA12 es una cepa mucosa aislada de personal de enfermería descrita en Ohlsen, K., Ziebuhr, W., Koller, K. P., Hell, W., Wichelhaus, T. A., y Hacker, J. "Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (hla) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates", Antimicrob. Agents Chemother. (1998), 42, páginas 2817 a 2823. Se permitió que la suspensión bacteriana permaneciera dentro de la luz del catéter durante 15 minutos. El contenido del catéter se enjuagó después en el ratón con 0.2 ml de solución salina al 0.9%. Los ratones tratados recibieron los anticuerpos producidos por la línea celular de hibridoma DSM ACC2987 i.v. (régimen de doble dosis: 15 mg/kg en un volumen de 100 μ l inmediatamente y 24 h después de la provocación bacteriana) o solución salina i.v. (grupo control). Se evaluó diariamente el peso corporal y el aspecto general durante el experimento. A los cinco días de la inoculación los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂.

Se extrajeron asépticamente los órganos de los ratones sacrificados y se homogeneizaron en 2 ml de solución salina. Además, se confirmó la ubicación del catéter en la vena cava superior y el catéter explantado se irrigó con 2 ml de solución salina y se recogió el líquido de irrigación. Se cultivaron diluciones seriadas de los homogeneizados de los órganos y el líquido del catéter recogido en placas de agar sal y manitol rojo fenol durante al menos 48 h a 37 °C. Se calcularon las unidades formadoras de colonia como ufc/órgano o ufc/catéter. Los resultados se muestran en la figura 4. Los datos muestran que el tratamiento con los anticuerpos según la invención resultó en una reducción significativa de la carga bacteriana de los órganos.

Para investigar el efecto de los anticuerpos según la invención sobre la fagocitosis, se aislaron neutrófilos humanos usando Polymorphprep (Nycomed, Oslo, Noruega) según las instrucciones del fabricante. Se incubaron 1×10^7 ufc de *S. aureus* MA12 en 1 ml de solución salina balanceada de Hank (HBSS) complementada con 0.1% (p/vol) de gelatina (HBSS-gel) y 15% (vol/vol) de anticuerpos MAB-UK-66 purificados producidos por la línea celular de hibridoma DSM ACC2987, o PBS (control) durante 30 minutos a 37 °C en un baño de agua con baja agitación. Se incubaron volúmenes iguales de 5×10^6 de *S. aureus* tratado con anticuerpo y PBS y 1×10^6 células PMN/ml HBSS-gel en un volumen final de 1.5 ml a 37 °C con baja agitación. A intervalos desde cero a 60 minutos se retiró una muestra de esta suspensión, se centrifugó durante 4 minutos a 250 x g, y se determinó el número de bacterias en el sobrenadante por recuento de ufc. La fagocitosis se expresa como la media de determinaciones por triplicado $\pm$ DE del número porcentual de bacterias extracelulares. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Para todas las comparaciones, un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los valores se expresaron como medias $\pm$ DE. El resultado que se muestra en la figura 5 demuestra que el *S. aureus* fue fagocitado por los leucocitos polimorfonucleares independientemente de la presencia de los anticuerpos según la invención. Sin embargo, con los anticuerpos según la invención el proceso de fagocitosis se aceleró significativamente en comparación con los controles. Los anticuerpos actúan como una opsonina para la fagocitosis de *S. aureus* por los leucocitos polimorfonucleares.

Para determinar la afinidad de los anticuerpos monoclonales MAB-UK-66 por IsaA se determinó la cinética de la unión de estos anticuerpos a IsaA inmovilizado mediante medición de resonancia de plasmones superficiales sin marcador utilizando el sistema BIACORE® 2000 (GE Healthcare Europe GmbH, Munzinger Strasse 5, 79111 Freiburg, Alemania). Para la inmovilización del antígeno, se N-biotiniló IsaA por incubación con concentraciones equimolares de sulfo-NHS-LC-biotina (Thermo Fisher Scientific, p/a Perbio Science, Adenauerallee 113, 53113 Bonn, Alemania). En estas condiciones la mayoría de las moléculas se biotinilaron solamente en un único sitio, dejando a la mayoría de los epítopos reconocidos por los anticuerpos monoclonales MAB-UK-66 inafectados. La inmovilización del antígeno en matrices de chips del biosensor CM5 recubiertas de estreptavidina se llevó a cabo como se describe en Nickel, J., Kotzsch, A., Sebald, W., y Mueller, T. D. "A single residue of GDF-5 defines binding specificity to BMP receptor IB" J. Mol. Biol. (2005), 349, páginas 933 a 947. La cantidad de antígeno inmovilizado corresponde a aproximadamente 100 unidades de resonancia [UR] medida con el sistema BIACORE®2000.

Se realizaron análisis de interacción usando tampón HBS150 (HEPES 10 mM pH7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3.4 mM). Se registraron sensorgramas a una velocidad de flujo de 10 μ l/min a 25 °C. El tiempo de asociación y disociación se fijó en 10 min. Los chips se regeneraron después de cada ciclo con diferentes soluciones de regeneración (A: CH₃COOH 1 mM, NaCl 1 M, pH 3; B: MgCl₂ 4 M; C: CH₃COOH 1 mM, NaCl 1 M, Urea 6 M, pH 3) durante 2 min. La cinética de la unión de estos anticuerpos a IsaA inmovilizado se muestra en la figura 6.

Todas las afinidades de unión aparentes se calcularon usando el software Biaevaluation 2.2.4. Se calcularon las afinidades de las interacciones k_{on} ($< 10^6$ M⁻¹s⁻¹) y k_{off} ($< 10^{-2}$ s⁻¹) ajustando los datos cinéticos de k_{on} y k_{off} a un modelo de unión de Langmuir 1:1. De esta manera se determinó la constante de disociación K_D . La constante de disociación K_D indica la afinidad entre dos moléculas que interaccionan (como un anticuerpo y el antígeno respectivo). Un valor bajo de K_D indica una alta afinidad en tanto un valor alto de K_D indica una baja afinidad. La desviación estándar de los valores de K_D determinado de esta manera es inferior a 50%. Las diferencias en las

afinidades de unión de más de un factor de dos se consideran, por tanto, significativas.

En las condiciones de medida descritas antes, los anticuerpos MAB-UK-66 interaccionan con los antígenos de 29 kDa IsaA de manera irreversible debido a las velocidades de disociación lentas no evaluables. Dado que la evaluación de la constante de velocidad cinética está limitada a 10^{-5} s^{-1} la velocidad de disociación observada debe ser menor que este valor. Fijando la velocidad de disociación en 10^{-5} s^{-1} se pudo determinar que la velocidad de asociación era de $5.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ lo que resulta en un valor para la constante de disociación de $1.8 \cdot 10^{-11} \text{ M}$. Por lo tanto, el valor de K_D para esta interacción es $\leq 1.8 \cdot 10^{-11} \text{ M}$. Es de destacar, que el anticuerpo no pudo ser eliminado de la superficie del chip después de la interacción con el antígeno usando todas las soluciones de regeneración descritas antes. Esto indica una interacción muy fuerte y altamente específica.

Para confirmar la alta afinidad del anticuerpo monoclonal MAB-UK-66 por IsaA se determinó la cinética de la unión de IsaA a anticuerpos inmovilizados mediante resonancia de plasmones superficiales sin marcador utilizando el sistema BIACORE® 2000 (GE Healthcare Europe GmbH, Munzinger Strasse 5, 79111 Freiburg, Alemania). Se realizó la inmovilización reversible del anticuerpo MAB-UK-66 empleando un anticuerpo anti-Fc de ratón acoplado covalentemente en alta densidad (18700 unidades de resonancia UR) a una superficie de sensor CM5 según las instrucciones del fabricante (Mouse Antibody Capture Kit, GE Healthcare). La cantidad promedio de anticuerpo MAB-UK-66 capturado sobre la superficie del anti-Fc de ratón corresponde a aproximadamente 640 UR. Se usó un blanco de superficie anti-Fc de ratón como superficie de control para monitorear uniones inespecíficas y realizar la sustracción de referencia. Se realizaron análisis de interacción usando tampón HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween 20 0.005%). Se registraron sensorgramas a una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ a 25 °C. Los tiempos de asociación y disociación se fijaron en 3 y 15 min, respectivamente. Las superficies de captura anti-Fc se regeneraron después de cada ciclo usando pulsos cortos de glicina 10 mM pH 1.7. La cinética de la unión de IsaA a anticuerpos monoclonales MAB-UK-66 inmovilizados se muestra en la figura 7.

Se calcularon las afinidades y las constantes de velocidad para la asociación (k_{on}) y la disociación (k_{off}) usando el software BIAevaluation 4.0.1 ajustando los sensorgramas obtenidos a un modelo de unión de Langmuir 1:1. De esta manera se determinó una constante de disociación K_D de 1.7 nM en dos mediciones independientes. Se determinó que las constantes de velocidad para la asociación y la disociación de la interacción entre MAB-UK-66 e IsaA eran $1.8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (k_{on}) y $2.9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (k_{off}), respectivamente.

En las condiciones de medición descritas antes, el anticuerpo MAB-UK-66 interacciona con el antígeno de 29 kDa IsaA con una alta afinidad y velocidad de disociación lenta lo que confirma una interacción fuerte y altamente específica como ya se determinó mediante la unión de los anticuerpos MAB-UK-66 a IsaA inmovilizado.

Para caracterizar el epítipo de IsaA que es reconocido por los anticuerpos o fragmentos según la invención se realizó un mapeo de epítipos. Para esto se sintetizaron oligopéptidos de 15 aminoácidos de longitud. La secuencia de cada uno de los oligonucleótidos es idéntica a una secuencia de 15 aminoácidos de IsaA. Cada oligonucleótido tiene una superposición de 11 aminoácidos con el oligonucleótido que representa una parte subsiguiente de la secuencia total. Las secuencias de los oligonucleótidos son las secuencias SEQ ID NO: 9 a 64 del listado de secuencias.

Cada oligonucleótido se inmovilizó en un pequeño punto sobre un portaobjetos de vidrio. Se examinó la unión de los anticuerpos monoclonales segregados por la línea celular de hibridoma DSM ACC2987 y de los anticuerpos de control a estos puntos luego de la incubación con estos anticuerpos mediante unión de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia y detección de las intensidades de fluorescencia. Los resultados se muestran en la tabla siguiente:

SEC. ID. N°:	Unión de anticuerpos segregados por la línea celular DSM ACC2987	Unión de anticuerpos de control
9	273,3	70
10	227,7	159,7
11	101,3	-11
12	679,7	-22
13	5748	366,7
14	3190	-35
15	11718,3	107
16	1951	117
17	17670,7	48

ES 2 537 437 T3

SEC. ID. N°:	Unión de anticuerpos segregados por la línea celular DSM ACC2987	Unión de anticuerpos de control
18	25327,7	-118,7
19	31946,3	83,7
20	1053	105,7
21	33295	182,3
22	21481,7	26,3
23	63890,7	366,7
24	9359,3	79,3
25	49296	-61,7
26	51825	261,3
27	441,7	81
28	3173,3	77,3
29	2486,3	85,7
30	1665,3	-7
31	2935	-20
32	59456	98,3
33	55515	-0,7
34	29452,3	98,7
35	505,7	110,3
36	2745	-14,3
37	139	-27,3
38	975,3	97,7
39	491,3	109,3
40	6010	-27
41	421	29,3
42	578,7	35,7
43	370,7	44,3
44	485,7	114,3
45	235	-4,3
46	587	-24,3
47	252	14,7
48	1168,3	397,7
49	399,3	40
50	192	-49,7
51	139,3	58
52	284,7	-60
53	577,3	70,3
54	569,7	-51,7
55	1033,3	36
56	959	-17,3

SEC. ID. N°:	Unión de anticuerpos segregados por la línea celular DSM ACC2987	Unión de anticuerpos de control
57	16756	312,7
58	1317,7	46,3
59	1404,3	132,3
60	3067,3	18,7
61	479	30,3
62	551,3	6,3
63	645,3	57,7
64	379	42

Como se puede observar en la tabla anterior las secuencias SEQ ID NO: 15, 17 a 19, 21 a 26, 32 a 34 y 57 están implicadas en la unión al epítipo de los anticuerpos segregados por línea celular DSM ACC2987.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Julius-Maximilians-Universitat Würzburg
 <120> ANTIBODIES OR FRAGMENTS THEREOF DIRECTED AGAINST A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
 EPITOPE
 <130> 506664EH
 <160> 64
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 < 211> 360
 < 212> DNA
 < 213> Mus musculus
 <400> 1
 atggccgatg tcaagcttgt ggaatctggg ggaggcttag tgaagcttgg agggteccctg 60
 aaactctcct gttcagcctc tggattcact ttcagtaact attacatgtc ttgggttcgc 120
 cagactccag agaagaggct ggagttggtc gcagacatta atggtaatgg tggtagcacc 180
 tactatccag acactgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaatgc caagaacacc 240
 ctgtacctgc aaatgagcag tctgaagtct gaggacacag ccttgtatta ctgtgtaaga 300
 cggggggggtt actacgcctt tgactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcgagt 360
 <210> 2
 < 211> 120
 < 212> PRT
 < 213> Mus musculus
 <400> 2

Met Ala Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Leu
1 5 10 15

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

Asn Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu
35 40 45

Leu Val Ala Asp Ile Asn Gly Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp
50 55 60

Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 340

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

gatgtggtga tgaccacagac cccgctctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gacgcttggt cacattaatg gaaacaccta ttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acagagtttc caaccgattt 180

tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttccg 300

tggacgttcg gtggaggggac caagctggag ctgaaacggg 340

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ile
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

Arg

<210> 5

<211> 354

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 5

gagggtgcaac tgcagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg ettctggcta cacctttacc acctactgga tgcactgggt aaaacagagg 120

cctggacagg gtctggaatg gattggcgct atttatcctg gaaatagtga taaaatgttc 180

aaccagaagt tcaaggacag ggccaaactg attgcagtca cgtccaccag cactgcctac 240

atggagctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcggtct attactgtac aagaggaact 300

gggacggaaa ttggtttgc ttactggggc caagggacca cggtcaccgt ctgc 354

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (58)..(60)

<223> Xaa Xaa Xaa can be Lys Met Phe or Thr Ser Tyr or Thr Thr Tyr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (66)..(66)

<223> Xaa can be Asp or Gly

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (67)..(67)

<223> Xaa can be Arg or Lys

<400> 6

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Xaa Xaa Xaa Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Xaa Xaa Ala Lys Leu Ile Ala Val Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Gly Thr Gly Thr Glu Ile Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser
 115

<210> 7
 <211> 338
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 7
 agtgcacaga ttttgctgac ccaatctcca tctctcttat ctgcctctct gggagaaaga 60
 gtcagtctca cttgtagggc aagtcaggac attggtacta gcttaaactg gcttcagagg 120
 gaaccagatg gaactattaa acgctgatc tacgccacat ccagtttaga ttctgggtgc 180
 cccaaaaggt tcagtggcag taggtctggg tcagattatt ctctcaccat cagcagcctt 240
 gagtctgaag attttgtaga ctattactgt gtccaatag tcagttctcc attcacgttc 300
 ggctcgggga ccaagctgga gctgaaacgg gcggccgc 338
 <210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa Xaa can be Leu Leu or Gln Met
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa can be Thr or Ser
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (40)..(40)
 <223> Xaa can be Arg or Gln
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (91)..(91)
 <223> Xaa can be Val or Leu
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (94)..(94)

5 < 223> Xaa can be Val or Ala
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (108)..(108)
 < 223> Xaa can be Leu or Ile
 <400> 8
 Ser Ala Gln Ile Xaa Xaa Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Gly Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly
 20 25 30
 Xaa Ser Leu Asn Trp Leu Gln Xaa Glu Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 65 70 75 80
 Glu Ser Glu Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Xaa Gln Tyr Xaa Ser Ser
 85 90 95
 Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Xaa Lys Arg Ala Ala
 100 105 110
 <210> 9
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 9
 Met Lys Lys Thr Ile Met Ala Ser Ser Leu Ala Val Ala Leu Gly
 1 5 10 15
 <210> 10
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 10
 Ile Met Ala Ser Ser Leu Ala Val Ala Leu Gly Val Thr Gly Tyr
 1 5 10 15
 <210> 11
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 11
 Ser Leu Ala Val Ala Leu Gly Val Thr Gly Tyr Ala Ala Gly Thr
 25 1 5 10 15
 <210> 12
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 12
 Ala Leu Gly Val Thr Gly Tyr Ala Ala Gly Thr Gly His Gln Ala
 30 1 5 10 15
 <210> 13
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 13
 35

Thr Gly Tyr Ala Ala Gly Thr Gly His Gln Ala His Ala Ala Glu
 1 5 10 15
 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 14
 Ala Gly Thr Gly His Gln Ala His Ala Ala Glu Val Asn Val Asp
 1 5 10 15
 <210> 15
 <211> 15
 10 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 15
 His Gln Ala His Ala Ala Glu Val Asn Val Asp Gln Ala His Leu
 1 5 10 15
 <210> 16
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 16
 Ala Ala Glu Val Asn Val Asp Gln Ala His Leu Val Asp Leu Ala
 1 5 10 15
 20 <210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 17
 Asn Val Asp Gln Ala His Leu Val Asp Leu Ala His Asn His Gln
 1 5 10 15
 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 18
 Ala His Leu Val Asp Leu Ala His Asn His Gln Asp Gln Leu Asn
 1 5 10 15
 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 19
 Asp Leu Ala His Asn His Gln Asp Gln Leu Asn Ala Ala Pro Ile
 1 5 10 15
 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 40 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 20
 Asn His Gln Asp Gln Leu Asn Ala Ala Pro Ile Lys Asp Gly Ala
 1 5 10 15
 <210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 45 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 21
 Gln Leu Asn Ala Ala Pro Ile Lys Asp Gly Ala Tyr Asp Ile His
 1 5 10 15
 50 <210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 22
 Ala Pro Ile Lys Asp Gly Ala Tyr Asp Ile His Phe Val Lys Asp
 1 5 10 15
 55

<210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 5 <400> 23
Asp Gly Ala Tyr Asp Ile His Phe Val Lys Asp Gly Phe Gln Tyr
1 5 10 15
 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 24
Asp Ile His Phe Val Lys Asp Gly Phe Gln Tyr Asn Phe Thr Ser
1 5 10 15
 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 25
Val Lys Asp Gly Phe Gln Tyr Asn Phe Thr Ser Asn Gly Thr Thr
1 5 10 15
 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 26
Phe Gln Tyr Asn Phe Thr Ser Asn Gly Thr Thr Trp Ser Trp Ser
1 5 10 15
 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 27
Phe Thr Ser Asn Gly Thr Thr Trp Ser Trp Ser Tyr Glu Ala Ala
1 5 10 15
 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 28
Gly Thr Thr Trp Ser Trp Ser Tyr Glu Ala Ala Asn Gly Gln Thr
1 5 10 15
 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 29
Ser Trp Ser Tyr Glu Ala Ala Asn Gly Gln Thr Ala Gly Phe Ser
1 5 10 15
 <210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 40 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 30
Glu Ala Ala Asn Gly Gln Thr Ala Gly Phe Ser Asn Val Ala Gly
1 5 10 15
 <210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 45 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 31
Gly Gln Thr Ala Gly Phe Ser Asn Val Ala Gly Ala Asp Tyr Thr
1 5 10 15
 55 <210> 32
 <211> 15

< 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 32
Gly Phe Ser Asn Val Ala Gly Ala Asp Tyr Thr Thr Ser Tyr Asn
1 5 10 15
 5 <210> 33
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 33
Val Ala Gly Ala Asp Tyr Thr Thr Ser Tyr Asn Gln Gly Ser Asp
1 5 10 15
 10 <210> 34
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 34
Asp Tyr Thr Thr Ser Tyr Asn Gln Gly Ser Asp Val Gln Ser Val
1 5 10 15
 15 <210> 35
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 35
Ser Tyr Asn Gln Gly Ser Asp Val Gln Ser Val Ser Tyr Asn Ala
1 5 10 15
 20 <210> 36
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 36
Gly Ser Asp Val Gln Ser Val Ser Tyr Asn Ala Gln Ser Ser Asn
1 5 10 15
 25 <210> 37
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 37
Gln Ser Val Ser Tyr Asn Ala Gln Ser Ser Asn Ser Asn Val Glu
1 5 10 15
 30 <210> 38
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 38
Tyr Asn Ala Gln Ser Ser Asn Ser Asn Val Glu Ala Val Ser Ala
1 5 10 15
 35 <210> 39
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 39
Ser Ser Asn Ser Asn Val Glu Ala Val Ser Ala Pro Thr Tyr His
1 5 10 15
 40 <210> 40
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 40
Asn Val Glu Ala Val Ser Ala Pro Thr Tyr His Asn Tyr Ser Thr
1 5 10 15
 45 <210> 41
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 41
Asn Val Glu Ala Val Ser Ala Pro Thr Tyr His Asn Tyr Ser Thr
1 5 10 15
 50 <210> 42
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 42
Asn Val Glu Ala Val Ser Ala Pro Thr Tyr His Asn Tyr Ser Thr
1 5 10 15
 55 <210> 43
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 43
Asn Val Glu Ala Val Ser Ala Pro Thr Tyr His Asn Tyr Ser Thr
1 5 10 15

<400> 41
Val Ser Ala Pro Thr Tyr His Asn Tyr Ser Thr Ser Thr Thr Ser
 1 5 10 15
 <210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 42
Thr Tyr His Asn Tyr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Ser Ser Val Arg
 1 5 10 15
 <210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 43
Tyr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Ser Ser Val Arg Leu Ser Asn Gly
 1 5 10 15
 <210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 44
Thr Thr Ser Ser Ser Val Arg Leu Ser Asn Gly Asn Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 <210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 45
Ser Val Arg Leu Ser Asn Gly Asn Thr Ala Gly Ala Thr Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 46
Ser Asn Gly Asn Thr Ala Gly Ala Thr Gly Ser Ser Ala Ala Gln
 1 5 10 15
 <210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 47
Thr Ala Gly Ala Thr Gly Ser Ser Ala Ala Gln Ile Met Ala Gln
 1 5 10 15
 <210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 48
Thr Gly Ser Ser Ala Ala Gln Ile Met Ala Gln Arg Thr Gly Val
 1 5 10 15
 <210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 49
Ala Ala Gln Ile Met Ala Gln Arg Thr Gly Val Ser Ala Ser Thr
 1 5 10 15
 <210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 50

Met Ala Gln Arg Thr Gly Val Ser Ala Ser Thr Trp Ala Ala Ile
 1 5 10 15
 <210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 51
 Thr Gly Val Ser Ala Ser Thr Trp Ala Ala Ile Ile Ala Arg Glu
 1 5 10 15
 <210> 52
 <211> 15
 10 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 52
 Ala Ser Thr Trp Ala Ala Ile Ile Ala Arg Glu Ser Asn Gly Gln
 1 5 10 15
 <210> 53
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 53
 Ala Ala Ile Ile Ala Arg Glu Ser Asn Gly Gln Val Asn Ala Tyr
 20 1 5 10 15
 <210> 54
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 54
 Ala Arg Glu Ser Asn Gly Gln Val Asn Ala Tyr Asn Pro Ser Gly
 1 5 10 15
 <210> 55
 <211> 15
 30 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 55
 Asn Gly Gln Val Asn Ala Tyr Asn Pro Ser Gly Ala Ser Gly Leu
 1 5 10 15
 <210> 56
 <211> 15
 35 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 56
 Asn Ala Tyr Asn Pro Ser Gly Ala Ser Gly Leu Phe Gln Thr Met
 40 1 5 10 15
 <210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 57
 Pro Ser Gly Ala Ser Gly Leu Phe Gln Thr Met Pro Gly Trp Gly
 45 1 5 10 15
 <210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 58
 Ser Gly Leu Phe Gln Thr Met Pro Gly Trp Gly Pro Thr Asn Thr
 1 5 10 15
 <210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 55 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 59

Gln Thr Met Pro Gly Trp Gly Pro Thr Asn Thr Val Asp Gln Gln
 1 5 10 15
 <210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 60
 Gly Trp Gly Pro Thr Asn Thr Val Asp Gln Gln Ile Asn Ala Ala
 1 5 10 15
 <210> 61
 <211> 15
 10 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 61
 Thr Asn Thr Val Asp Gln Gln Ile Asn Ala Ala Val Lys Ala Tyr
 1 5 10 15
 <210> 62
 15 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 62
 Asp Gln Gln Ile Asn Ala Ala Val Lys Ala Tyr Lys Ala Gln Gly
 1 5 10 15
 20 <210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 63
 Asn Ala Ala Val Lys Ala Tyr Lys Ala Gln Gly Leu Gly Ala Trp
 1 5 10 15
 25 <210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 64
 Ala Val Lys Ala Tyr Lys Ala Gln Gly Leu Gly Ala Trp Gly Phe
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Los anticuerpos o fragmentos de éstos que son dirigidos contra un epítipo de *Staphylococcus aureus* que es reconocido por otros anticuerpos monoclonales que son segregados por la línea celular de hibridoma depositada en el DSMZ con el número de registro DSM ACC2987, donde el epítipo contiene al menos una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 13 aminoácidos a una de las secuencias SEQ ID NO: 15, 17 a 19, 21 a 26, 32 a 34 y 57
o
donde cada uno de los anticuerpos tiene una cadena pesada con una primera región variable y una cadena ligera con una segunda región variable, donde la primera región variable contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 2 y donde la segunda región variable contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 4.
2. Los anticuerpos o fragmentos como los reivindicados en la reivindicación 1, donde los anticuerpos son anticuerpos monoclonales, especialmente los otros anticuerpos monoclonales.
3. Los anticuerpos como los reivindicados en la reivindicación 2, donde los anticuerpos monoclonales o los otros anticuerpos monoclonales son anticuerpos del tipo IgG, en particular del tipo IgG1 o del tipo IgG2b.
4. Los fragmentos reivindicados en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los fragmentos son fragmentos Fab, fragmentos Fab/c, fragmentos Fv, fragmentos Fab' o fragmentos F(ab')₂.
5. Los anticuerpos o fragmentos como los reivindicados en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los anticuerpos son anticuerpos animales, especialmente especialmente anticuerpos murinos, bovino, o camélidos, anticuerpos humanos, anticuerpos producidos en una planta, un huevo o un hongo, en particular un *Saccharomyces*, anticuerpos recombinados producidos en las células de una línea celular, anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados.
6. Los anticuerpos o fragmentos como los reivindicados en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde cada uno de los anticuerpos tiene una cadena pesada con una primera región variable y una cadena ligera con una segunda región variable, donde la primera región variable contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 92.5% idéntica, en particular al menos 95% idéntica, en particular al menos 97.5% idéntica, en particular 100% idéntica, a la secuencia SEQ ID NO: 2 y donde la segunda región variable contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 92.5% idéntica, en particular al menos 95% idéntica, en particular al menos 97.5% idéntica, en particular 100% idéntica, a la secuencia SEQ ID NO: 4.
7. Los anticuerpos o fragmentos como los reivindicados en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el epítipo contiene al menos una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos 14 aminoácidos, en particular 15 aminoácidos, a una de las secuencias SEQ ID NO: 15, 17 a 19, 21 a 26, 32 a 34 y 57
8. Los anticuerpos a fragmentos como los reivindicados en cualquiera de las reivindicaciones precedentes para utilizar como un medicamento.
9. Los anticuerpos o fragmentos como los reivindicados en la reivindicación 8, donde el medicamento es un medicamento destinado al tratamiento de un ser humano o de un animal donde el ser humano o el animal tiene una infección por *Staphylococcus aureus*, especialmente *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina o sensible a la metilicina, o corre riesgo de contraer dicha infección.
10. Los anticuerpos o fragmentos como los reivindicados en la reivindicación 9, donde el ser humano o el animal tiene una mastitis o una septicemia causada por la infección.
11. Los anticuerpos o fragmentos como los reivindicados en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde los anticuerpos o fragmentos están presentes en una mezcla con otros anticuerpos o fragmentos de esos otros anticuerpos, donde esos otros anticuerpos están dirigidos contra el menos otro epítipo del *Staphylococcus aureus*.
12. Los anticuerpos o fragmentos como los reivindicados en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde los anticuerpos o fragmentos están presentes en una mezcla con al menos un antibiótico.
13. Los anticuerpos o fragmentos como los reivindicados en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, donde los anticuerpos o fragmentos están presentes en una mezcla con plasma sanguíneo de un mamífero, especialmente de un ser humano.

14. Los anticuerpos o fragmentos como los reivindicados en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, donde el medicamento es un medicamento para administración sistémica y/o aplicación local.
- 5 15. Un kit que contiene anticuerpos o fragmentos como los reivindicados en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la detección de *Staphylococcus aureus*.
16. El uso de anticuerpos o fragmentos como los reivindicados en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la detección de *Staphylococcus aureus*.
- 10 17. Una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
18. La línea celular de hibridoma como la reivindicada en la reivindicación 17, donde dicha línea celular de hibridoma es la línea celular depositada en el DSMZ con el número de registro DSM ACC2987.



Fig. 1 a

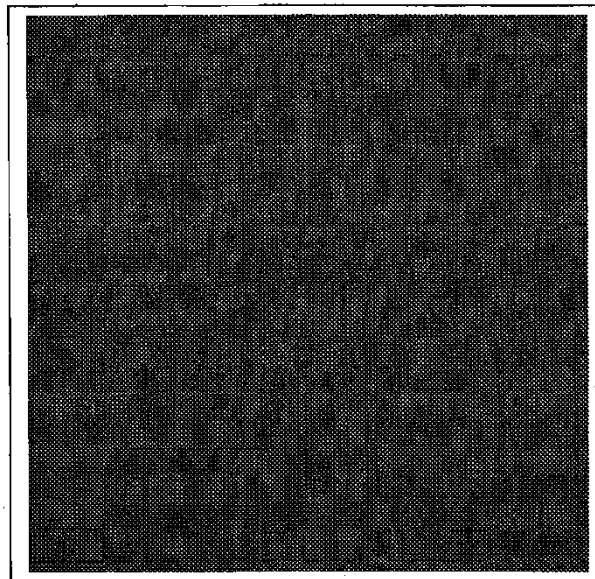


Fig. 1 b

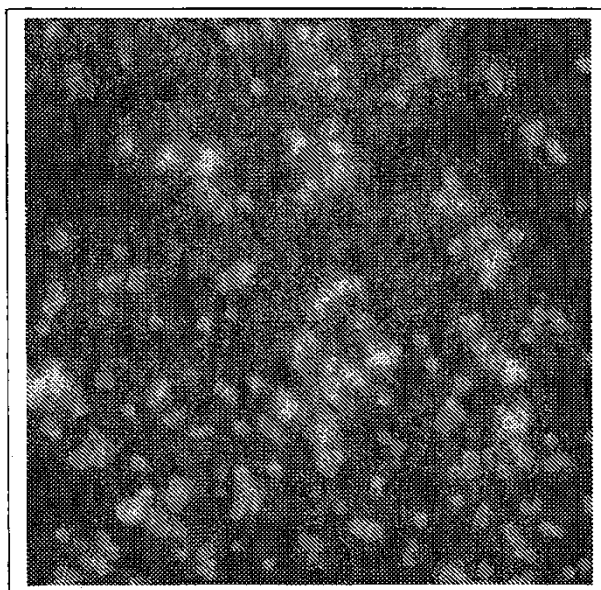


Fig. 1c

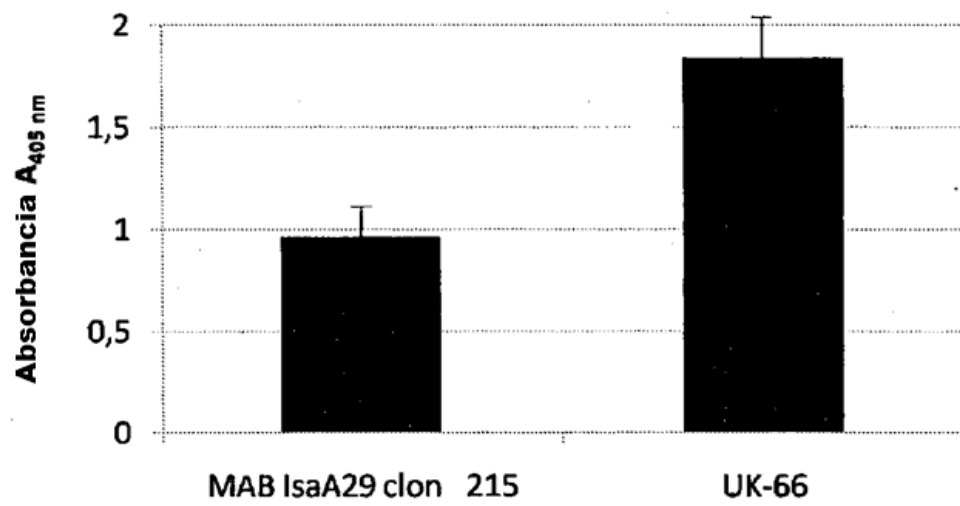


Fig. 2

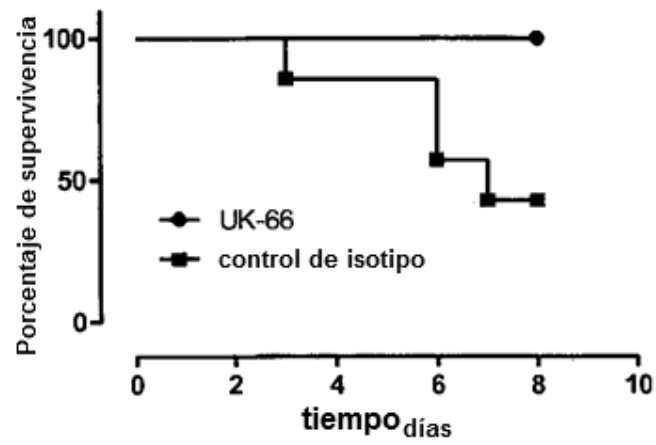


Fig. 3

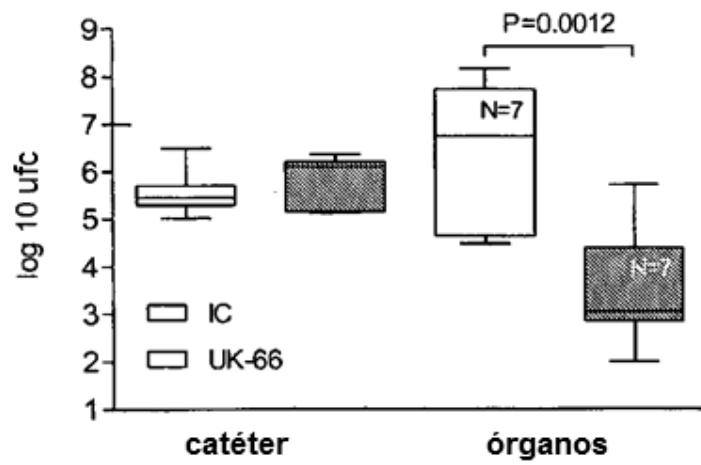


Fig. 4

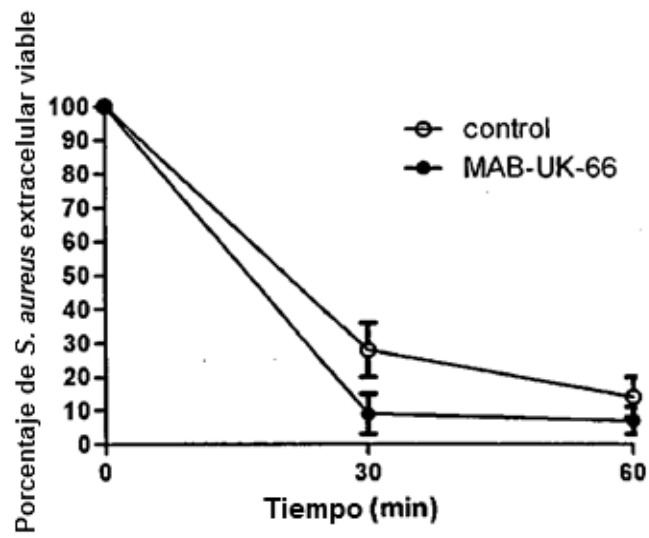


Fig. 5

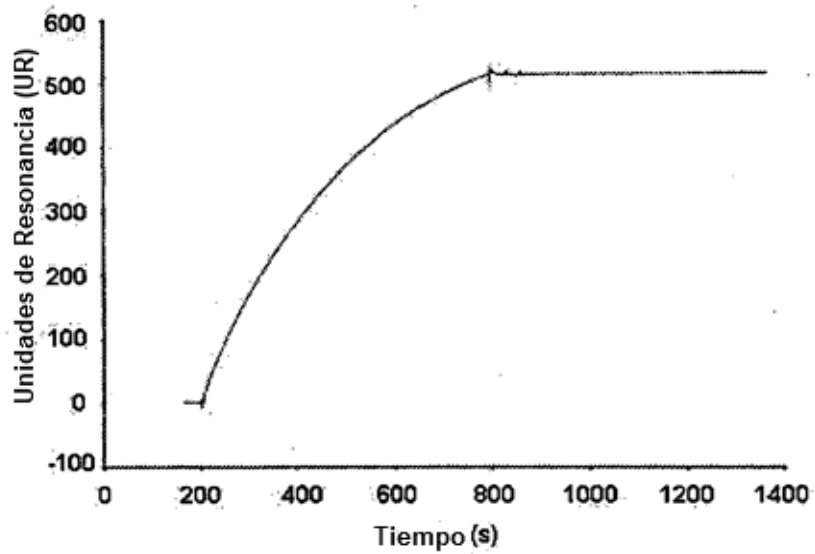


Fig. 6

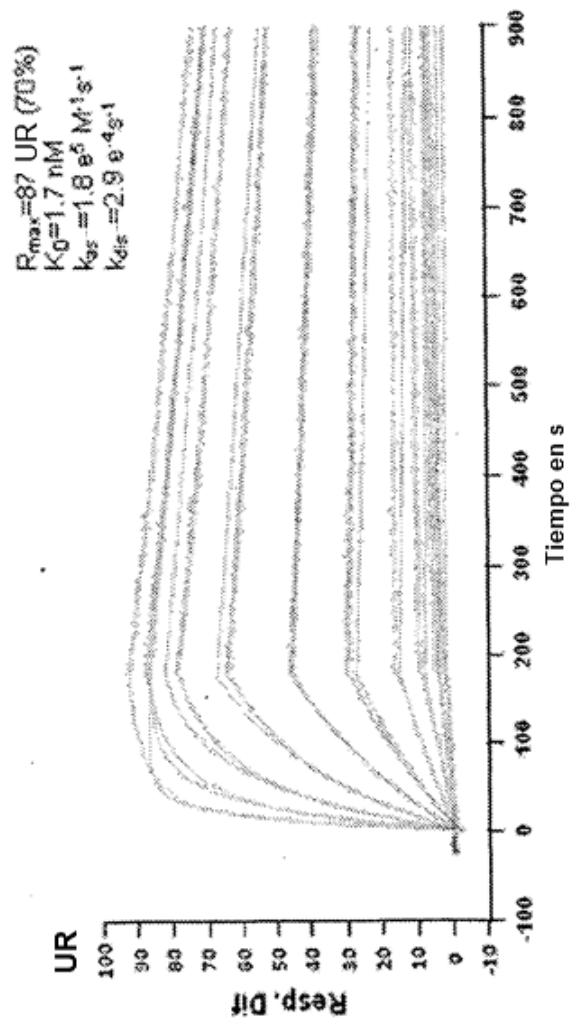


Fig. 7