

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 105**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/12** (2006.01)

**A61K 39/40** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2013 E 13728122 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2668208**

54 Título: **Anticuerpo de reacción cruzada contra Staphylococcus aureus**

30 Prioridad:

**17.04.2012 EP 12164506**

**11.01.2013 EP 13151010**

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

**18.09.2015**

73 Titular/es:

**ARSANIS BIOSCIENCES GMBH (100.0%)  
Helmut-Qualtinger-Gasse 2  
1030 Vienna, AT**

72 Inventor/es:

**NAGY, ESZTER;  
BADARAU, ADRIANA;  
ROUHA, HARALD;  
STULIK, LUKAS;  
NAGY, GÁBOR;  
MIRKINA, IRINA;  
MAGYARICS, ZOLTÁN;  
VISRAM, ZEHRA;  
JAEGERHOFER, MICHAELA;  
ZERBS, MANUEL;  
DOLEZILKOVA, IVANA;  
TEUBENBACHER, ASTRID;  
BATTLES, MICHAEL BENJAMIN y  
PRINZ, BIANKA DOMINIQUE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 546 105 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpo de reacción cruzada contra *Staphylococcus aureus*

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 *Staphylococcus aureus*, un importante patógeno humano, expresa una multitud de toxinas de secreción (exotoxinas) que pueden destruir varios tipos celulares diferentes, entre los que se incluyen eritrocitos, granulocitos neutrófilos y otras células inmunitarias, así como células epiteliales del pulmón o la piel. Además, la mayoría de estas toxinas  
10 activan a algunas células inmunitarias y actúan como potentes señales proinflamatorias.

Un miembro destacado de las citotoxinas de *S. aureus* es la hemolisina alfa (Hla), que ejerce una función citolítica sobre las células endoteliales y epiteliales de pulmón humanas, los linfocitos y los macrófagos. También puede lisar  
15 glóbulos rojos (GR) de conejo, pero es mucho menos tóxica para los GR humanos. La Hla se considera el factor de virulencia clave en la patogénesis de la neumonía por *S. aureus* y responsable de las lesiones tisulares debidas a la lisis de células epiteliales pulmonares y al reclutamiento de células inmunitarias en grandes cantidades. Las células fagocíticas reclutadas, principalmente los granulocitos neutrófilos, se convierten en dianas de otras citotoxinas producidas por *S. aureus* durante la enfermedad. Las toxinas más potentes son las citolisinas de dos componentes, o leucocidinas, formadas por un componente L (de elución lenta) y un componente R (de elución rápida). Los productos  
20 del gen de la hemolisina gamma (Hlg) - expresados de forma universal por todas las cepas de *S. aureus* - pueden formar dos toxinas: HlgAB y HlgCB (la subunidad B es el componente R), siendo ambas muy potentes en la destrucción de células inmunitarias humanas: PMN, linfocitos y macrófagos. La primera también es una hemolisina muy potente para los GR humanos.

25 La leucocidina de Pantón Valentine (PVL), también denominada LukSF, es la toxina de dos componentes mejor caracterizada. La portan elementos genéticos derivados de fagos, y se produce por aproximadamente un 5-10% de las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes, sin embargo, se ha notificado que el porcentaje de células que expresan PVL es del 50-93% en las infecciones de la piel y los tejidos blandos, dependiendo del tipo de enfermedad (Lina, Clin Infect Dis, 1999:1128). LukED (LukD es el componente R) es una leucocidina menos potente, pero se ha confirmado  
30 que está presente en la mayoría de los aislados clínicos de *S. aureus* (Shukla, J Clin Microbiol, 2010:3582). Inicialmente, su actividad solo se asoció con infecciones de la piel, pero al ser la menos caracterizada entre las toxinas de dos componentes, no puede excluirse su contribución a otros tipos de infecciones por *S. aureus*. Recientemente se ha notificado que LukED está implicada en infecciones del torrente sanguíneo en un modelo murino de infección por *S. aureus* (Alonzo, Mol Microbiol, 2012:423). Estos dos pares de genes comparten una homología significativa entre sí  
35 (identidad de aminoácidos del 68-82%), mientras que la leucocidina LukGH identificada recientemente (LukG es el componente R) tiene menor homología, con una identidad del 33-40% (Ventura, PloS ONE, 2010:e11634; DuMont, Mol Microbiol, 2011:814).

40 Se ha determinado la estructura cristalina de Hla, LukS, LukF, HlgA y HlgB, y ha revelado alguna homología estructural, a pesar del bajo nivel de homología de aminoácidos entre Hla y las subunidades de las toxinas de dos componentes que supone una identidad de aminoácidos del 16-28% (Galdiero, Protein Sci, 2004:1503; Pedelacq, Structure, 1999:277; Menestrina, FEBS Letters, 2003:54). Todas estas toxinas forman una estructura parecida a un anillo formada por subunidades oligomerizadas, que lleva a la formación de poros dentro de la membrana celular y a la posterior citólisis. En el caso de Hla, se ha demostrado que el poro es heptamérico, pero en el caso de las toxinas de  
45 dos componentes, se han notificado heterooligómeros hexaméricos (Comai, Mol Microbiol, 2002:1251), heptaméricos y octaméricos (Yamashita, PNAS, 2011:17314), lo cual ha originado un debate dentro de la comunidad científica (revisado con detalle por Kaneko, Biosci Biotechnol Biochem, 2004:981).

Los diferentes componentes R y L de esta familia de toxinas pueden formar no solo pares afines (siendo estos:  
50 LukS-LukF, LukE-LukD, HlgC-HlgB, HlgA-HlgB y LukH-LukG), sino también pares no afines, habiéndose notificado muchos de estos pares por Gravet *et al.* (Gravet, FEBS Letters, 1998:202) y por Dalla Serra *et al.* para las hemolisinas gamma y LukS (Dalla Serra, J Chem Inf Model, 2005:1539). Debido a la redundancia y a la naturaleza promiscua de esta familia de toxinas, es poco probable que la inactivación de un solo componente sea eficaz para combatir las infecciones por *S. aureus*. Esta idea se confirma por observaciones indicadas en la bibliografía en las que la neutralización de una sola toxina de dos componentes solo afectaba parcialmente al fenotipo (por ejemplo, Ventura, PloS ONE, 2010:e11634; Malachowa, PloS ONE, 2011:e18617). Los estudios realizados en animales mostraron un impacto diferencial de las diversas toxinas de dos componentes sobre la supervivencia, dependiendo del modelo empleado o de la especie usada para los experimentos *in vivo*. Se observó la mayor reducción en la gravedad de la enfermedad cuando se eliminaron múltiples toxinas, por ejemplo, en un modelo de infección de ratón usando una cepa  
60 knock-out de *S. aureus* en la que se había inactivado el sistema Agr de detección de quórum, un regulador global de la expresión de toxinas (Kobayashi, J Infect Dis, 2011:204). Por lo tanto, es de esperar que mezclas de anticuerpos que neutralicen más toxinas ofrezcan una ventaja significativa en relación con los mAb con respecto a las toxinas individuales. Sin embargo, es difícil crear mezclas de anticuerpos monoclonales (mAb) que comprenden más de tres componentes.

65

Ohlsen *et al.* (International Journal of Medical Microbiology 300 (2010) 402-410) describen estrategias inmunoterapéuticas para combatir infecciones por estafilococos, por ejemplo, al describir anticuerpos específicos para Hla, o la neutralización de PVL por anticuerpos anti-PVL *in vitro*.

5 La probabilidad de encontrar anticuerpos sencillos que presentaran reacción cruzada entre la hemolisina alfa y cualquiera de las toxinas de dos componentes se consideró baja, basándose en la baja homología de secuencia (<30%) entre Hla y las toxinas de dos componentes. Es de esperar que sea mayor la posibilidad de encontrar anticuerpos sencillos que presenten reacción cruzada entre los componentes L y R, debido al mayor nivel de homología de secuencia, con la excepción de LukGH. Se ha descrito que el suero hiperinmunitario procedente de animales inmunizados con LukS puede reconocer HlgC, sin embargo, esto se debe a la presencia de diferentes especificidades en el suero policlonal. Laventie *et al.* (Laventie, PNAS, 2011:16404) describieron un anticuerpo neutralizador bi-específico contra LukS y HlgC. Sin embargo, este tipo de anticuerpo no puede formar una fuerte interacción debido a que los sitios de unión en el antígeno afín son individuales. La reactividad cruzada de estos mAb bi-específicos normalmente está imitada a dos especificidades, es decir, no ofrece la posibilidad de neutralización cruzada amplia. En resumen, hasta la fecha no se ha notificado ningún mAb de reacción cruzada contra diferentes toxinas de *S. aureus* de dos componentes o contra la hemolisina alfa y cualquiera de las toxinas de dos componentes.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

20 El objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo dirigido contra las diferentes citotoxinas de *S. aureus* con mejor potencia de reacción cruzada y neutralización cruzada.

El objeto se consigue con el contenido de la presente invención.

25 De acuerdo con la invención, se proporciona un anticuerpo de neutralización cruzada que neutraliza la toxina alfa (Hla) y al menos una de las toxinas de dos componentes de *Staphylococcus aureus*, donde el anticuerpo comprende al menos un sitio de unión poliespecífico que se une a la toxina alfa (Hla) y que se une a al menos una de las toxinas de dos componentes de *Staphylococcus aureus*.

30 Específicamente, la toxina de dos componentes se selecciona del grupo que consiste en pares afines y no afines de componentes R y L de las hemolisinas gamma (HlgABC), PVL (LukSF) y toxinas parecidas a PVL, preferentemente cualquiera de HlgAB, HlgCB, LukSF, LukED, LukGH, LukS-HlgB, LukSD, HlgA-LukD, HlgA-LukF, LukG-HlgA, LukEF, LukE-HlgB, HlgC-LukD o HlgC-LukF.

35 Preferentemente, el sitio de unión se une a al menos dos o a al menos tres toxinas de dos componentes, preferentemente a al menos dos o tres de cualquiera de HlgAB, HlgCB, LukSF y LukED, preferentemente a todas las siguientes: HlgAB, HlgCB, LukSF y LukED.

40 De acuerdo con una realización específica, el sitio de unión es un sitio de unión de CDR, preferentemente que comprende las secuencias de CDR de un sitio de unión de VH y/o VL.

45 Específicamente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de longitud completa o un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende al menos un dominio de anticuerpo que incorpora el sitio de unión, preferentemente un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados o humanos, anticuerpos de cadena pesada, Fab, Fd, scFv y anticuerpos de un solo dominio tales como VH, VHH o VL, preferentemente un anticuerpo IgG1 humano.

50 El anticuerpo preferentemente tiene una afinidad para unirse a cada una de las toxinas con una Kd menor de  $10^{-8}$  M, preferentemente menor de  $10^{-9}$  M.

De acuerdo con un aspecto específico, el anticuerpo presenta potencia de neutralización *in vitro* en un ensayo basado en células con un valor de CI50 en relación de mAb:toxina (mol/mol) menor de 50:1, preferentemente menor de 10:1, y más preferentemente menor de 1:1.

55 De acuerdo con otro aspecto específico, el anticuerpo neutraliza las toxinas diana en animales, incluyendo tanto, animales no humanos como seres humanos, e inhibe la patogénesis de *S. aureus in vivo*, preferentemente cualquier modelo de neumonía, bacteremia o septicemia, peritonitis y osteomielitis.

60 De acuerdo con un aspecto específico, el anticuerpo comprende las seis secuencias de CDR de un anticuerpo denominado #AB-24, comprendiendo dicho anticuerpo denominado #AB-24

(a) una cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-LC cuya secuencia codificante está incluida en la célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26748; y

65 (b) una cadena pesada de anticuerpo denominada #AB-24-HC cuya secuencia codificante está incluida en la célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26747.

De acuerdo con una realización específica, el anticuerpo se une al mismo epítopo que un anticuerpo denominado #AB-24.

5 De acuerdo con otra realización específica, el anticuerpo comprende el mismo sitio de unión que un anticuerpo denominado #AB-24.

De acuerdo con otra realización específica, el anticuerpo se une al mismo epítopo que un anticuerpo denominado #AB-24.

10 Específicamente, el anticuerpo es o procede de un anticuerpo producido por una célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26747 y/o DSM 26748, o una variante funcionalmente activa de la misma.

Específicamente, el anticuerpo comprende

- 15 (a) una cadena ligera de anticuerpo producida por una célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26748; y/o  
(b) una cadena pesada de anticuerpo producida por una célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM DSM 26747;  
20 (c) o una variante funcionalmente activa de (a) y/o (b).

De acuerdo con otro aspecto, en el presente documento se proporciona un plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos

- 25 - que codifica una cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-LC incluida en una célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26748; y/o  
- que codifica una cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-HC incluida en una célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26747.

30 De acuerdo con otro aspecto, en el presente documento se proporciona un casete de expresión que comprende una secuencia codificante para expresar un anticuerpo de acuerdo con la invención, procediendo dicho casete de expresión o secuencia codificante del plásmido.

35 De acuerdo con otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método para producir un anticuerpo de la invención, en el que una célula hospedadora se transforma con el plásmido o el casete de expresión.

Se prefiere específicamente una célula hospedadora y un método de producción que emplea dicha célula hospedadora, comprendiendo dicha célula hospedadora

- 40 - el plásmido o casete de expresión, que incorpora una secuencia codificante para expresar la cadena ligera de anticuerpo; y  
- el plásmido o casete de expresión, que incorpora una secuencia codificante para expresar la cadena pesada de anticuerpo.

45 De acuerdo con otro aspecto, en el presente documento se proporciona una célula hospedadora que comprende el plásmido o el casete de expresión.

Específicamente, la célula hospedadora de la invención comprende

- 50 (a) un casete de expresión que codifica una cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-LC, estando dicha secuencia codificante incluida en la célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26748; y  
(b) un casete de expresión que codifica una cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-HC, estando dicha secuencia codificante incluida en la célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26747.

55 Específicamente, la invención se refiere a una célula hospedadora, que está depositada con el número de depósito DSM 26747 o DSM 26748. Dicha célula hospedadora es una célula hospedadora *E. coli* transformada con un plásmido. Específicamente, la célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26748 se ha transformado con un plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-LC; y la célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26747 se ha transformado con un plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de anticuerpo denominada #AB-24-HC.  
60

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo de la invención, en el que la célula hospedadora de la invención se cultiva o se mantiene en condiciones adecuadas para producir dicho anticuerpo.

65

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un método para identificar un anticuerpo protector candidato que comprende:

- 5 (a) proporcionar una muestra que contiene un anticuerpo o célula productora de anticuerpos; y
- (b) evaluar la competición cruzada de un anticuerpo presente en o producido por la muestra, denominándose el anticuerpo #AB-24, por la unión a la toxina alfa y a al menos una toxina de dos componentes de *Staphylococcus aureus*, donde la competición cruzada identifica al anticuerpo como un anticuerpo protector candidato.

10 De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un método para identificar un anticuerpo protector candidato que comprende:

- 15 (a) proporcionar una muestra que contiene un anticuerpo o célula productora de anticuerpos; y
- (b) evaluar la unión de un anticuerpo presente en o producido por la muestra a la toxina alfa y a al menos una toxina de dos componentes de *Staphylococcus aureus*, donde una reacción positiva entre el anticuerpo y las toxinas identifica al anticuerpo como un anticuerpo protector candidato.

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo de la invención, que comprende

- 20 (a) proporcionar un anticuerpo protector candidato identificado de acuerdo con el método de identificación de la invención; y
- (b) producir un anticuerpo monoclonal, o una forma humanizada o humana del anticuerpo protector candidato, o un derivado del mismo que compite de forma cruzada con el anticuerpo denominado #AB-24 por la unión a la toxina alfa y a al menos una toxina de dos componentes de *Staphylococcus aureus*, comprendiendo dicho anticuerpo denominado #AB-24
  - 25 i) una cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-LC, estando dicha secuencia codificante incluida en la célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26748; y
  - 30 ii) una cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-HC, estando dicha secuencia codificante incluida en la célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26747.

De acuerdo con otro aspecto, en el presente documento se proporciona un método para producir un anticuerpo de la invención, que comprende

- 35 (a) inmunizar a un animal no humano con un epítipo reconocido por el anticuerpo denominado #AB-24;
- (b) formar líneas celulares inmortalizadas a partir de los linfocitos B aislados;
- (c) explorar las líneas celulares obtenidas en b) para identificar una línea celular que produce un anticuerpo monoclonal que se une al epítipo; y
- (d) producir el anticuerpo monoclonal, o una forma humanizada o humana del anticuerpo, o un derivado del mismo con la misma especificidad de unión a epítipo que el anticuerpo monoclonal.

40 De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo de la invención, que comprende

- 45 (a) inmunizar a un animal no humano con la toxina alfa y al menos una toxina de dos componentes de *Staphylococcus aureus* y aislar los linfocitos B productores de anticuerpos;
- (b) formar líneas celulares inmortalizadas a partir de los linfocitos B aislados;
- (c) explorar las líneas celulares para identificar una línea celular productora de un anticuerpo monoclonal que se une a la toxina alfa y a al menos una toxina de dos componentes de *Staphylococcus aureus*; y
- 50 (d) producir el anticuerpo monoclonal, o una forma humanizada o humana del anticuerpo, o un derivado del mismo con la misma especificidad de unión a epítipo que el anticuerpo monoclonal.

De acuerdo con otro aspecto, La invención proporciona un anticuerpo de la invención para uso médico, incluyendo el uso médico para seres humanos y el uso veterinario. Específicamente, el anticuerpo se proporciona para su uso en el tratamiento de un sujeto con riesgo de padecer o que padece una infección por *S. aureus*, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo para limitar la infección en el sujeto, para mejorar un estado patológico debido a dicha infección o para inhibir la patogénesis de la neumonía por *S. aureus*.

Específicamente, el anticuerpo se proporciona para proteger frente a las infecciones por *S. aureus*.

60 De acuerdo con un aspecto específico, además se proporciona un método de tratamiento, en el que se trata a un sujeto con riesgo de padecer o que padece una infección por *S. aureus*, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo para limitar la infección en el sujeto, para mejorar un estado patológico debido a dicha infección o para inhibir la patogénesis de la neumonía por *S. aureus*.

65 Específicamente, el método de tratamiento se proporciona para proteger frente a *S. aureus* patogénico.

De acuerdo con una realización específica, el anticuerpo se administra en una formulación parenteral o para la administración en la mucosa.

5 De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona una preparación farmacéutica de un anticuerpo de la invención, que comprende preferentemente una formulación parenteral o para la administración en la mucosa, que contiene opcionalmente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo de la invención, para uso diagnóstico para detectar cualquier infección por *S. aureus*, incluyendo infecciones por SARM (*S. aureus* resistente a meticilina) que producen un alto nivel de toxinas, tales como neumonía necrotizante, y la producción de toxinas en furunculosis y carbunculosis.

15 Específicamente, el anticuerpo se proporciona para su uso de acuerdo con la invención, en el que se determina una infección sistémica con *S. aureus* en un sujeto *ex vivo* poniendo en contacto una muestra de fluido corporal de dicho sujeto con el anticuerpo, determinándose la infección por una reacción inmunitaria específica del sujeto.

20 De acuerdo con un aspecto específico, se proporciona además un método de diagnóstico de una infección por *S. aureus* en un sujeto, incluyendo infecciones por SARM (*S. aureus* resistente a meticilina) que producen un alto nivel de toxinas, tales como neumonía necrotizante, y la producción de toxinas en la furunculosis y carbunculosis.

Específicamente, se proporciona el método de diagnóstico, en el que se determina una infección sistémica con *S. aureus* en un sujeto *ex vivo* poniendo en contacto una muestra de fluido corporal de dicho sujeto con el anticuerpo, determinándose la infección por una reacción inmunitaria específica del sujeto.

25 De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona una preparación de diagnóstico de un anticuerpo de la invención, que contiene opcionalmente el anticuerpo con un marcador y/o un reactivo de diagnóstico adicional con un marcador.

30 De acuerdo con otro aspecto, en el presente documento se proporciona un epítipo conformacional aislado reconocido por un anticuerpo denominado #AB-24. Dicho epítipo puede consistir en un solo epítipo o en una mezcla de epítipos que comprenden variantes del epítipo, reconocidos todos ellos por el anticuerpo denominado #AB-24.

De acuerdo con otro aspecto, en el presente documento se proporciona un inmunógeno que comprende:

- 35 (a) un epítipo de la divulgación;  
(b) opcionalmente otros epítipos no asociados de forma nativa con dicho epítipo de (a); y  
(c) un vehículo.

40 Específicamente, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable, que comprende preferentemente sustancias tampón y/o coadyuvantes.

Preferentemente, el inmunógeno se proporciona en una formulación de vacuna, preferentemente para uso parenteral.

45 Específicamente, el inmunógeno se proporciona para uso médico, específicamente para su uso en el tratamiento de un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz de dicho inmunógeno para proteger al sujeto de una infección por *S. aureus*, para prevenir un estado patológico debido a dicha infección o para inhibir la patogénesis de la neumonía por *S. aureus*.

50 Específicamente, el inmunógeno se proporciona para inducir una respuesta inmunitaria protectora.

De acuerdo con un aspecto específico, además se proporciona un método de tratamiento, en el que se trata a un sujeto con riesgo de padecer una infección por *S. aureus*, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad eficaz del inmunógeno para prevenir la infección en el sujeto, en particular para proteger frente a *S. aureus* patogénico.

55 De acuerdo con otro aspecto, en el presente documento se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de la invención, o que codifica un epítipo de la divulgación.

## FIGURAS

60 Figura 1: Figura esquemática que representa los componentes de toxinas producidas en formas recombinantes para la exploración de mAb.

Figura 2: Determinación de la potencia de neutralización de Hla de anticuerpos monoclonales *in vitro*, tal como se describe en el Ejemplo 3.

65 A: usando glóbulos rojos de conejo B: usando células epiteliales de pulmón humanas (línea celular A549 (de la ATCC))

Figura 3: Afinidad (Kd) de mAb específicos de Hla vírgenes y de afinidad madurada con potencia neutralizadora, tal como se describe en el Ejemplo 3.

Figura 4: Potencia de neutralización *in vitro* de mAb de Hla de afinidad madurada, incluyendo el mAb de Hla de neutralización cruzada #AB-24 (denominado #9028) como se describe en el Ejemplo 3.

5 Figura 5: Afinidad (Kd) del mAb de Hla de neutralización cruzada amplia #AB-24 (denominado #9028) por componentes R de leucocidinas, tal como se describe en el Ejemplo 3.

Figura 6: Potencia de neutralización *in vitro* del linaje #7667. Ensayo de neutralización de hemolisina alfa sobre células A549 (A), y neutralización de LukS-LukF (B), HlgC-HlgB (C), tal como se describe en el Ejemplo 4. Nota: #AB-24 se denomina en el presente documento #9028.

10 Figura 7: Protección de ratones frente a la exposición a la toxina letal por tratamiento con anticuerpos monoclonales, tal como se describe en el Ejemplo 5. Nota: #AB-24 se denomina en el presente documento #9028. Exposición intranasal a Hla; exposición intravenosa a HlgAB.

Figura 8: Competición entre mAb de Hla determinada en Forte-Bio, tal como se describe en el Ejemplo 6.

Figura 9: Secuencias de la toxina de *S. aureus* obtenidas como se describe en el Ejemplo 1.

15 SEC ID N°: 1 Secuencia de nucleótidos de Hla de la cepa USA300 TCH1516 (Genbank, número de referencia CP000730)

SEC ID N°: 2: Secuencia de aminoácidos de Hla de la cepa USA300 TCH1516

SEC ID N°: 3: Secuencia de nucleótidos de LukS de la cepa USA300 TCH1516

20 SEC ID N°: 4: Secuencia de aminoácidos de la cepa USA300 TCH1516

SEC ID N°: 5: Secuencia de nucleótidos de LukF de la cepa USA300 TCH1516

SEC ID N°: 6: Secuencia de aminoácidos de LukF de la cepa USA300 TCH1516

SEC ID N°: 7: Secuencia de nucleótidos de LukE de la cepa USA300 TCH1516

SEC ID N°: 8: Secuencia de aminoácidos de LukE de la cepa USA300 TCH1516

25 SEC ID N°: 9: Secuencia de nucleótidos de LukD de la cepa USA300 TCH1516

SEC ID N°: 10: Secuencia de aminoácidos de LukD de la cepa USA300 TCH1516

SEC ID N°: 11: Secuencia de nucleótidos de HlgA de la cepa USA300 TCH1516

SEC ID N°: 12: Secuencia de aminoácidos de HlgA de la cepa USA300 TCH1516

SEC ID N°: 13: Secuencia de nucleótidos de HlgC de la cepa USA300 TCH1516

SEC ID N°: 14: Secuencia de aminoácidos de HlgC de la cepa USA300 TCH1516

30 SEC ID N°: 15: Secuencia de nucleótidos de HlgB de la cepa USA300 TCH1516

SEC ID N°: 16: Secuencia de aminoácidos de HlgB de la cepa USA300 TCH1516

SEC ID N°: 17: Secuencia de nucleótidos de LukH de la cepa USA300 TCH1516

SEC ID N°: 18: Secuencia de aminoácidos de LukH de la cepa USA300 TCH1516

35 SEC ID N°: 19: Secuencia de nucleótidos de LukG de la cepa USA300 TCH1516

SEC ID N°: 20: Secuencia de aminoácidos de LukG de la cepa USA300 TCH1516

SEC ID N°: 21: Secuencia de nucleótidos de la cepa MRSA252 (Genbank, número de referencia BX571856)

SEC ID N°: 22: Secuencia de aminoácidos de LukH de la cepa MRSA252 SEC ID N°: 23: Secuencia de nucleótidos de LukG de la cepa MRSA252

SEC ID N°: 24: Secuencia de aminoácidos LukG de la cepa MRSA252

40 SEC ID N°: 25: Secuencia de nucleótidos de la cepa MSHR1132 (Genbank, número de referencia FR821777)

SEC ID N°: 26: Secuencia de aminoácidos de LukH de la cepa MSHR1132

SEC ID N°: 27: Secuencia de nucleótidos de LukG de la cepa MSHR1132

SEC ID N°: 28: Secuencia de aminoácidos LukG de la cepa MSHR1132

#### 45 DESCRIPCIÓN DETALLADA

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, hará referencia a polipéptidos o proteínas que consisten o comprenden dominios de anticuerpo, que se entienden como dominios constantes y/o variables de las cadenas ligeras y/o pesadas de inmunoglobulinas, con o sin una secuencia enlazadora. Polipéptidos se entienden como dominios de anticuerpo, si comprenden una estructura de barril beta que consiste en al menos dos cadenas beta de una estructura de dominio de anticuerpo conectadas por una secuencia de lazo. Los dominios de anticuerpo pueden ser de estructura nativa o pueden estar modificados por mutagénesis o derivatización, por ejemplo, para modificar las propiedades de unión a antígeno o cualquier otra propiedad, tal como la estabilidad o las propiedades funcionales, tales como la unión a los receptores de Fc FcRn y/o el receptor Fcγ.

55 El anticuerpo, como se usa en el presente documento, tiene un sitio de unión específico para unirse a uno o más antígenos o uno o más epítomos de dichos antígenos, que comprende específicamente un sitio de unión de CDR de un solo dominio de anticuerpo variable, tal como VH, VL o VHH, o un sitio de unión de pares de dominios de anticuerpo variables, tales como un par VL/VH, un anticuerpo que comprende un par de dominios VL/VH y dominios de anticuerpo constantes, tal como Fab, F(ab'), (Fab)<sub>2</sub>, scFv, Fv, o un anticuerpo de longitud completa.

60 El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, hará referencia, en particular, a formatos de anticuerpo que comprenden o que consisten en un solo dominio de anticuerpo variable, tal como VH, VL o VHH, o combinaciones de dominios de anticuerpo variables y/o constantes con o sin una secuencia de unión o región de bisagra, incluyendo pares de dominios de anticuerpo variables, tales como un par VL/VH, un anticuerpo que comprende o consiste en un par de dominios VL/VH y dominios de anticuerpo constantes, tal como anticuerpos de

cadena pesada, Fab, F(ab'), (Fab)<sub>2</sub>, scFv, Fd, Fv, o un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, de un tipo IgG (por ejemplo, un subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE, o anticuerpo IgM. La expresión "anticuerpo de longitud completa" puede usarse para hacer referencia a cualquier molécula de anticuerpo que comprende al menos la mayor parte del dominio Fc y otros dominios encontrados habitualmente en un monómero de anticuerpo natural. Esta frase se usa en el presente documento para subrayar que una molécula de anticuerpo particular no es un fragmento de anticuerpo.

El término "anticuerpo" incluirá específicamente anticuerpos en forma aislada, que carecen sustancialmente de otros anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos diana o que comprenden una disposición estructural diferente de dominios de anticuerpo. Además, un anticuerpo aislado puede estar incluido en una preparación de combinación, que contiene una combinación del anticuerpo aislado, por ejemplo, con al menos otro anticuerpo, tal como anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo que tienen diferentes especificidades.

El término "anticuerpo" se aplicará a anticuerpos de origen animal, incluyendo seres humanos, tales como mamíferos, incluyendo seres humanos, ratones, conejos, cabras, llamas, vacas y caballos, o aves de corral, tales como gallinas.

El término "anticuerpo" se aplica también a anticuerpos quiméricos con secuencias procedentes de diferentes especies, tales como secuencias de origen murino y humano.

El término "quimérico", como se usa con respecto a un anticuerpo, se refiere a los anticuerpos en los que una parte de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera es homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase particular, mientras que el segmento restante de la cadena es homólogo a secuencias correspondientes de otra especie o clase. Típicamente, la región variable tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada imita a las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamífero, mientras que las partes constantes son homólogas a secuencias de anticuerpos derivadas de otra. Por ejemplo, la región variable puede proceder de fuentes actualmente conocidas usando linfocitos B fácilmente adquiribles o hibridomas de organismos hospedadores no humanos en combinación con regiones constantes procedentes de, por ejemplo, preparaciones de células humanas.

El término "anticuerpo" se aplica también a anticuerpos humanizados.

El término "humanizado", como se usa con respecto a un anticuerpo, se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígenos que procede sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, donde la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula está basada en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados sobre dominios constantes o solo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas sobre regiones marco conservadas en los dominios variables. Los sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados, por ejemplo, por una o más sustituciones de aminoácidos, preferentemente modificados para parecerse más a inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen una o más CDR que están alteradas con respecto al anticuerpo original.

El término "anticuerpo" se aplica también a anticuerpos humanos.

Se entiende que el término "humano", como se usa con respecto a un anticuerpo, incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. El anticuerpo humano de la invención puede incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica del emplazamiento *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR. Los anticuerpos humanos incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas.

El término se aplica específicamente a anticuerpos de cualquier clase o subclase. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos pueden asignarse a las clases principales de anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas clases se puede subdividir en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2.

El término se aplica además a anticuerpos monoclonales o policlonales, específicamente un anticuerpo recombinante, incluyendo dicho término todos los anticuerpos y estructuras de anticuerpo que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos procedentes de animales, por ejemplo, mamíferos incluyendo seres humanos, que comprenden genes o secuencias de diferente origen, por ejemplo anticuerpos quiméricos humanizados, o anticuerpos derivados de hibridoma. Otros ejemplos se refieren a anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, o anticuerpos aislados a partir de una biblioteca combinatoria recombinante de anticuerpos o dominios de anticuerpo, o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de anticuerpos a otras secuencias de ADN.



Se entiende que el término "anticuerpo" también se refiere a derivados de un anticuerpo, en particular, derivados funcionalmente activos. Un derivado de anticuerpo se entiende como cualquier combinación de uno o más dominios de anticuerpo o anticuerpos y/o una proteína de fusión, en la que cualquier dominio del anticuerpo puede fusionarse a cualquier posición de una o más proteínas distintas, tales como otros anticuerpos, por ejemplo, una estructura de unión que comprende bucles de CDR, un polipéptido receptor, pero también ligandos, proteínas almacén, enzimas, toxinas y similares. Un derivado del anticuerpo puede obtenerse por asociación o unión a otras sustancias por diversas técnicas químicas tales como acoplamiento covalente, interacción electrostática, formación de enlaces disulfuro etc. Las otras sustancias unidas al anticuerpo pueden ser lípidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas, o cualquier combinación de las mismas (p. ej., PEG, profármacos o fármacos). En una realización específica, el anticuerpo es un derivado que comprende un indicador adicional que permite la interacción específica con un compuesto biológicamente aceptable. No hay una limitación específica con respecto al indicador que puede usarse en la presente invención, siempre que no haya ningún impacto negativo o haya un impacto tolerable sobre la unión del anticuerpo a su diana. Los ejemplos de indicador adecuados incluyen el indicador His, indicador Myc, indicador FLAG, indicador Strep, indicador Calmodulina, indicador GST, indicador MBP, e indicador S. En otra realización específica, el anticuerpo es un derivado que comprende un marcador. El término "marcador", como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo para generar un anticuerpo "marcado". El marcador puede ser detectable por sí mismo, por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes, o, en el caso de un marcador enzimático, pueden catalizar la alteración química del compuesto o composición de sustrato que es detectable.

Los derivados preferidos descritos en el presente documento son funcionalmente activos con respecto a la unión del antígeno, preferentemente son los que tienen potencia para neutralizar *S. aureus* y/o los que son anticuerpos protectores.

Debe entenderse que el término "anticuerpo" también se refiere a variantes de un anticuerpo.

El término "variante" hará referencia en particular a anticuerpos, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo mutantes, por ejemplo, obtenidos por métodos de mutagénesis, en particular para eliminar, cambiar, introducir insertos en una secuencia de aminoácidos específica de un anticuerpo o modificar químicamente una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, en los dominios constantes para mejorar mediante ingeniería genética la estabilidad, función efectora o semivida del anticuerpo, o en los dominios variables para mejorar las propiedades de unión al antígeno, por ejemplo, por técnicas de maduración de afinidad disponibles en este campo. Se puede usar cualquiera de los métodos de mutagénesis conocidos, incluyendo mutaciones puntuales en sitios deseados, por ejemplo, obtenidas por técnicas de aleatorización. En algunos casos, las posiciones se eligen de forma aleatoria, por ejemplo, con cualquiera de los aminoácidos posibles o una selección de aminoácidos preferidos para aleatorizar las secuencias de anticuerpos. El término "mutagénesis" se refiere a cualquier técnica reconocida en este campo para alterar una secuencia polinucleotídica o polipeptídica. Los tipos preferidos de mutagénesis incluyen mutagénesis de PCR propensa a errores, mutagénesis de saturación, u otras mutagénesis dirigidas.

El término "variante" incluirá específicamente variantes funcionalmente activas.

La expresión "variante funcionalmente activa" de un anticuerpo, como se usa en el presente documento, significa una secuencia resultante de la modificación de esta secuencia (un anticuerpo parental o una secuencia parental) por inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos, o la derivatización química de uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos, o nucleótidos dentro de la secuencia de nucleótidos, o en uno o los dos extremos distales de la secuencia, sin que dicha modificación afecte (en particular, perjudique) a la actividad de esta secuencia. En el caso de un sitio de unión que tiene especificidad por un antígeno diana seleccionado, la variante funcionalmente activa de un anticuerpo tendría la especificidad de unión predeterminada, aunque esto podría cambiarse, por ejemplo, para cambiar la especificidad fina por un epítipo específico, la afinidad, la avidéz, el valor de Kon o Koff, etc. Específicamente, las variantes funcionalmente activas de la invención tienen el sitio de unión poliespecífico que se une a Hla y al menos una de las toxinas de dos componentes de *S. aureus*, como se describe adicionalmente en el presente documento.

Las variantes funcionalmente activas pueden obtenerse, por ejemplo, cambiando la secuencia de un anticuerpo parental, por ejemplo, un anticuerpo que comprende el mismo sitio de unión que el anticuerpo denominado #AB-24, pero con modificaciones dentro de una región de anticuerpo aparte del sitio de unión, u obtenerse a partir de un anticuerpo parental, que es el anticuerpo #AB-24, por una modificación que no perjudique a la unión del antígeno, y preferentemente debe tener una actividad biológica similar a la del anticuerpo parental, incluyendo la capacidad de unirse a toxinas de *S. aureus* y/o neutralizar *S. aureus* con una potencia específica, por ejemplo, con sustancialmente la misma actividad biológica, lo cual se determina por un ensayo funcional o un ensayo de unión específica al *S. aureus* diana o a toxinas de *S. aureus*. La expresión "sustancialmente la misma actividad biológica", como se usa en el presente documento, se refiere a la actividad indicada por sustancialmente la misma actividad que es de al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o incluso al menos un 100% o al menos un 110%, o al menos un 120%, o al menos un 130%, o al menos un 140%, o al

menos un 150%, o al menos un 160%, o al menos un 170%, o al menos un 180%, o al menos un 190%, por ejemplo, hasta un 200% de la actividad determinada para el anticuerpo parental.

En una realización preferida, la variante funcionalmente activa de un anticuerpo parental

- 5 a) es un fragmento biológicamente activo del anticuerpo, comprendiendo el fragmento al menos el 50% de la secuencia de la molécula, preferentemente al menos un 70%, de forma más preferente al menos un 80%, aún más preferentemente al menos un 90%, incluso más preferentemente al menos un 95% y aún más preferentemente al menos un 97%, 98% o 99%;
- 10 b) se obtiene a partir del anticuerpo mediante al menos una sustitución, adición y/o deleción de aminoácido, donde la variante funcionalmente activa tiene una identidad de secuencia con la molécula o parte de ella, tal como un anticuerpo con una identidad de secuencia de al menos un 50%, preferentemente al menos un 60%, de forma más preferente al menos un 70%, de forma más preferente al menos un 80%, aún más preferentemente al menos un 90%, incluso más preferentemente al menos un 95% y aún más preferentemente al menos un 97%, 98% o 99%; y/o
- 15 c) consiste en el anticuerpo o una variante funcionalmente activa del mismo y además al menos un aminoácido o nucleótido heterólogo al polipéptido o a la secuencia de nucleótidos.

En una realización preferida de la invención, la variante funcionalmente activa del anticuerpo de acuerdo con la invención es esencialmente idéntica a la variante descrita anteriormente, pero difiere de su polipéptido o la secuencia de nucleótidos, respectivamente, ya que procede de una secuencia homóloga de una especie diferente. Estas se denominan análogos o variantes naturales.

La expresión "variante funcionalmente activa" también incluye variantes alélicas naturales, así como mutantes o cualquier otra variante no natural. Como se conoce en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de un (poli) péptido que se caracteriza por tener una sustitución, eliminación o adición de uno o más aminoácidos que no alteran esencialmente la función biológica del polipéptido.

Las variantes funcionalmente activas pueden obtenerse por alteraciones de secuencias en el polipéptido o la secuencia de nucleótidos, por ejemplo, por una o más mutaciones puntuales, donde las alteraciones de la secuencia mantienen una función del polipéptido o la secuencia de nucleótidos no alterada, cuando se usan en la combinación de la invención. Dichas alteraciones de secuencias pueden incluir, pero sin limitación, sustituciones (conservativas), adiciones, eliminaciones, mutaciones e inserciones.

Son variantes funcionalmente activas específicas variantes de CDR. Una variante de CDR incluye una secuencia de aminoácidos modificada por al menos un aminoácido en la región de CDR, donde dicha modificación puede ser una alteración química o una alteración parcial de la secuencia de aminoácidos, permitiendo dicha modificación que la variante conserve las características biológicas de la secuencia no modificada. Una alteración parcial de la secuencia de aminoácidos de CDR puede ser por deleción o sustitución de uno a varios aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o por adición o inserción de uno a varios aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o por derivatización química de uno a varios aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o una combinación de las mismas. Las sustituciones en los restos de aminoácidos pueden ser sustituciones conservativas, por ejemplo, la sustitución de un aminoácido hidrófobo por un aminoácido hidrófobo alternativo.

Las sustituciones conservativas son las que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales y propiedades químicas. Son ejemplos de dichas familias aminoácidos con cadenas laterales básicas, con cadenas laterales ácidas, con cadenas laterales alifáticas no polares, con cadenas laterales aromáticas no polares, con cadenas laterales polares no cargadas, con cadenas laterales pequeñas, con cadenas laterales largas etc.

Una mutación puntual se entiende particularmente como la obtención por ingeniería genética de un polinucleótido que se obtiene como resultado de la expresión de una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos no modificada por ingeniería genética en la sustitución o cambio, deleción o inserción de uno o más aminoácidos individuales (no consecutivos) o parejas de aminoácidos por aminoácidos diferentes.

Las mutaciones puntuales preferidas se refieren al intercambio de aminoácidos de la misma polaridad y/o carga. En este sentido, los aminoácidos se refieren a los veinte aminoácidos naturales codificados por sesenta y cuatro codones de tripletes. Estos 20 aminoácidos se pueden dividir en los que tienen cargas neutras, cargas positivas, y cargas negativas:

Los aminoácidos "neutros" se muestran más adelante junto con su código respectivo de tres letras y de una sola letra y polaridad:

- Alanina: (Ala, A) no polar, neutra;  
 Asparagina: (Asn, N) polar, neutra;  
 65 Cisteína: (Cys, C) no polar, neutra;  
 Glutamina: (Gln, Q) polar, neutra;

Glicina: (Gly, G) no polar, neutra;  
 Isoleucina: (Ile, I) no polar, neutra;  
 Leucina: (Leu, L) no polar, neutra;  
 Metionina: (Met, M) no polar, neutra;  
 5 Fenilalanina: (Phe, F) no polar, neutra;  
 Prolina: (Pro, P) no polar, neutra;  
 Serina: (Ser, S) polar, neutra;  
 Treonina: (Thr, T) polar, neutra;  
 10 Triptófano: (Trp, W) no polar, neutro;  
 Tirosina (Tyr, Y) polar, neutra;  
 Valina: (Val, V) no polar, neutra; e  
 Histidina: (His, H) polar, positiva (10%) neutra (90%).

Los aminoácidos cargados "positivamente" son:

15 Arginina: (Arg, R) polar, positiva; y  
 Lisina: (Lys, K) polar, positiva

Los aminoácidos cargados "negativamente" son:

20 Ácido aspártico: (Asp, D) polar, negativo; y  
 Ácido glutámico: (Glu, E) polar, negativo.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de anticuerpos y homólogos descritos en el presente documento se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos de la secuencia polipeptídica específica, después de alinear las secuencias e introducir los espacios en blanco, en caso necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en cuenta las posibles sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando.

Específicamente se entiende que una variante de anticuerpo incluye homólogos, análogos, fragmentos, modificaciones o variantes con un patrón de glicosilación específico, por ejemplo, producidos por glicoingeniería, que son funcionales y pueden servir como equivalentes funcionales, por ejemplo, que se unen a las dianas específicas y con propiedades funcionales. Las variantes preferidas descritas en el presente documento son funcionalmente activas con respecto a la unión al antígeno, preferentemente son las que tienen potencia para neutralizar *S. aureus* y/o las que son anticuerpos protectores.

Un anticuerpo de la presente invención puede presentar o no función efectora de Fc. Aunque el modo de acción principalmente está mediado por la neutralización de anticuerpos sin funciones efectoras de Fc, Fc puede reclutar el complemento y ayudar a la eliminación del antígeno diana, tal como una toxina, de la circulación por medio de la formación de complejos inmunitarios.

Ciertos anticuerpos específicos pueden carecer de un resto de Fc activo, por lo tanto, están compuestos de dominios de anticuerpo que no contienen una parte Fc de un anticuerpos o que no contienen un sitio de unión al receptor Fc $\gamma$ , o comprenden dominios de anticuerpo que carecen de función efectora de Fc, por ejemplo, por modificaciones para reducir las funciones efectoras de Fc, en particular, para anular o reducir la actividad ADCC y/o CDC. Pueden obtenerse por ingeniería genética anticuerpos alternativos para incorporar modificaciones que aumenten las funciones efectoras de Fc, en particular que aumenten la actividad ADCC y/o CDC.

Estas modificaciones pueden realizarse por mutagénesis, por ejemplo, mutaciones en el sitio de unión del receptor Fc $\gamma$  o por derivados o agentes para interferir con la actividad ADCC y/o CDC de un formato de anticuerpo, para conseguir la reducción o aumento de la función efectora de Fc.

Típicamente se entiende que una reducción significativa de la función efectora de Fc se refiere a una función efectora de Fc menor del 10% del formato no modificado (de tipo silvestre), preferiblemente menor del 5%, medida por la actividad ADCC y/o CDC.

Típicamente se entiende que un aumento significativo de la función efectora de Fc se refiere a un aumento en la función efectora de Fc de al menos un 10% del formato no modificado (de tipo silvestre), preferentemente al menos un 20%, 30%, 40% o 50%, medida por la actividad ADCC y/o CDC.

La expresión variantes "obtenidas por glicoingeniería" con respecto a las secuencias de anticuerpo hará referencia a variantes de glicosilación que tienen propiedades inmunogénicas modificadas, ADCC y/o CDC como resultado de la glicoingeniería. Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidratos en posiciones conservadas en las regiones constantes de las cadenas pesadas, poseyendo cada isotipo una serie distinta de estructuras de N-carbohidratos, que afectan de forma variable al ensamblaje, secreción o actividad funcional de las proteínas. Los

anticuerpos de tipo IgG1 son glicoproteínas que tienen un sitio de N-glicosilación conservado en la Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos complejos biantenarios unidos a Asn297 están sepultados entre los dominios CH2, formando contactos extensos con la cadena principal del polipéptido, y su presencia es esencial para el anticuerpo para mediar funciones efectoras tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La eliminación de N-Glicano en N297, por ejemplo, por mutación de N297, por ejemplo a A, o T299 típicamente da como resultado formatos de anticuerpo aglicosilados con una ADCC reducida.

Existen diferencias importantes en la glicosilación de anticuerpos entre líneas celulares, e incluso se observan diferencias minoritarias para una línea celular dada cultivada en diferentes condiciones de cultivo. La expresión en células bacterianas típicamente proporciona un anticuerpo aglicosilado. Se notificó que las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (Gn-TIII), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc de bisección, tenían mayor actividad ADCC (Umana *et al.*, 1999, Nature Biotech. 17:176-180). Además de la elección de las células hospedadoras, los factores que afectan a la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen el modo de cultivo, la formulación del medio, la densidad del cultivo, la oxigenación, el pH, los esquemas de purificación y similares.

La expresión "sitio de unión a antígeno" o "sitio de unión" se refiere a la parte de un anticuerpo que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión al antígeno está formado por restos de aminoácidos de las regiones N-terminales variables ("V") de las cadenas pesadas ("H") y/o ligeras ("L"), o los dominios variables de las mismas. Tres tramos muy divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesadas y ligeras, denominadas "regiones hipervariables", están interpuestas entre tramos flanqueantes más conservados conocidos como regiones marco conservadas. El sitio de unión al antígeno proporciona una superficie que es complementaria a la superficie tridimensional de un epítipo o antígeno unido, y las regiones hipervariables se denominan "regiones determinantes de complementariedad", o "CDR". El sitio de unión incorporado en las CDR también se denomina en el presente documento "sitio de unión de CDR".

El término "antígeno", como se usa en el presente documento indistintamente con los términos "diana" o "antígeno diana" hará referencia a una molécula diana entera o a un fragmento de dicha molécula reconocido por un sitio de unión de anticuerpo. Específicamente, pueden reconocerse por dicho sitio de unión subestructuras de un antígeno, por ejemplo, un polipéptido o estructura de carbohidrato, denominadas generalmente "epítipos", por ejemplo, epítipos de linfocitos B o epítipos de linfocitos T, que son inmunológicamente relevantes.

El término "epítipo", como se usa en el presente documento, se referirá, en particular, a una estructura molecular que puede formar completamente una pareja de unión específica o ser parte de una pareja de unión específica a un sitio de unión de un anticuerpo. Un epítipo puede estar compuesto por un hidrato de carbono, una estructura peptídica, un ácido graso, una sustancia orgánica, bioquímica o inorgánica, o derivados de los mismos y cualquier combinación de los mismos. Si un epítipo está compuesto por una estructura peptídica, tal como un péptido, un polipéptido o una proteína, normalmente incluirá al menos 3 aminoácidos, preferentemente de 5 a 40 aminoácidos, y más preferentemente entre aproximadamente 10 y 20 aminoácidos. Los epítipos pueden ser epítipos lineales o conformacionales. Un epítipo lineal está compuesto por un único segmento de una secuencia primaria de un polipéptido o cadena de carbohidrato. Los epítipos lineales pueden ser contiguos o solapantes. Los epítipos conformacionales están compuestos por aminoácidos o carbohidratos juntados plegando el polipéptido para formar una estructura terciaria y los aminoácidos no son necesariamente adyacentes entre sí en la secuencia lineal. Específicamente y con respecto a los antígenos polipeptídicos, un epítipo conformacional o discontinuo se caracteriza por la presencia de dos o más restos de aminoácidos discretos, separados en la secuencia primaria, pero que se ensamblan formando una estructura consistente en la superficie de la molécula cuando el polipéptido se pliega en la proteína nativa/antígeno.

En el presente documento, el término "epítipo" hará referencia en particular al epítipo individual reconocido por un anticuerpo, o la mezcla de epítipos que comprenden variantes de epítipos, estando reconocido cada uno por un anticuerpo de reacción cruzada.

El término "expresión" se entiende de la siguiente manera. Para fines de expresión, pueden usarse moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia codificante deseada de un producto de expresión tal como, por ejemplo, un anticuerpo como se describe en el presente documento, y secuencias de control tales como, por ejemplo, un promotor unido operativamente. Los hospedadores transformados o transfectados con estas secuencias pueden producir las proteínas codificadas. Con el fin de efectuar la transformación, el sistema de expresión puede estar incluido en un vector; sin embargo, el ADN relevante puede también estar integrado en el cromosoma del hospedador. Específicamente, el término se refiere a una célula hospedadora y un vector compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada por un ADN extraño que porta el vector e introducida en la célula hospedadora.

Un ADN codificante es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos particular para obtener un polipéptido o proteína particular tal como, por ejemplo, un anticuerpo. Un ADN promotor es una secuencia de ADN que inicia, regula, o media o controla de otra manera la expresión del ADN codificante. El ADN promotor y el ADN codificante pueden proceder del mismo gen o de genes diferentes, y pueden proceder del mismo organismo o de

organismos diferentes. Los vectores de clonación recombinantes con frecuencia incluirán uno o más sistemas de replicación para clonación o expresión, uno o más marcadores para selección en el hospedador, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de expresión.

5 Los "vectores" usados en el presente documento se definen como secuencias de ADN que son necesarias para la transcripción de secuencias de nucleótidos recombinantes, es decir, de genes recombinantes y la traducción de su ARNm en un organismo hospedador adecuado.

10 Un "casete de expresión" se refiere a una secuencia codificante de ADN que codifica un producto de expresión que puede insertarse en un vector en sitios de restricción definidos. Los sitios de restricción del casete están diseñados para asegurar la inserción del casete en el marco de lectura apropiado. En general, se inserta ADN extraño en uno o más sitios de restricción del ADN del vector, y después se porta por el vector en una célula hospedadora junto con un ADN de vector transmisible. Un segmento o secuencia de ADN que tiene ADN insertado o añadido, tal como un vector de expresión, también puede denominarse "construcción de ADN".

15 Los vectores de expresión comprenden el casete de expresión y además normalmente comprenden un origen para la replicación autónoma en las células hospedadoras o un sitio de integración en el genoma, uno o más marcadores de selección (por ejemplo, un gen de síntesis de aminoácidos o un gen que confiere resistencia a antibióticos tales como zeocina, kanamicina, G418 o higromicina), varios sitios de escisión por enzimas de restricción, una secuencia promotora adecuada y un terminador de la transcripción, estando dichos componentes unidos operativamente entre sí. El término "vector", como se usa en el presente documento, incluye secuencias de nucleótidos de replicación autónoma así como secuencias de nucleótidos de integración en el genoma. Un tipo común de vector es un "plásmido", que generalmente es una molécula autocontenida de ADN bicatenario que puede aceptar fácilmente ADN adicional (extraño) y que puede introducirse fácilmente en una célula hospedadora adecuada. Un vector de plásmido con frecuencia contiene ADN codificante y ADN promotor y tiene uno o más sitios de restricción adecuados para insertar ADN extraño. Específicamente, el término "vector" o "plásmido" se refiere a un vehículo mediante el cual puede introducirse una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) en una célula hospedadora, para transformar el hospedador y promover la expresión (por ejemplo, la transcripción y la traducción) de la secuencia introducida.

30 La expresión "célula hospedadora", como se usa en el presente documento, hará referencia a células primarias del sujeto transformadas para producir una proteína recombinante particular, tal como un anticuerpo como se describe en el presente documento, y cualquier descendencia del mismo. Debe entenderse que no toda la descendencia es exactamente idéntica a la célula parental (debido a mutaciones deliberadas o involuntarias o a diferencias en el medio), sin embargo, dicha descendencia alterada se incluye en esta expresión, siempre que la descendencia conserve la misma funcionalidad que la célula transformada originalmente. La expresión "línea de célula hospedadora" se refiere a una línea celular de células hospedadoras usadas para expresar un gen recombinante para producir polipéptidos recombinantes tales como anticuerpos recombinantes. La expresión "línea celular", como se usa en el presente documento, se refiere a un clon establecido de un tipo celular particular que ha adquirido la capacidad de proliferar durante un periodo de tiempo prolongado. Dicha célula hospedadora o línea de célula hospedadora puede mantenerse en cultivo celular y/o cultivarse para producir un polipéptido recombinante.

45 Una "respuesta inmunitaria" a una composición, por ejemplo, una composición inmunogénica en el presente documento, también denominada "inmunógeno" que comprende un antígeno o epítipo, o una vacuna como se describe en el presente documento, es el desarrollo en el hospedador o sujeto de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos contra la composición o vacuna de interés. Generalmente, dicha respuesta consiste en que el sujeto produce anticuerpos, linfocitos B, linfocitos T auxiliares, linfocitos T supresores, y/o linfocitos T citotóxicos dirigidos específicamente contra un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés.

50 Una "respuesta inmunitaria protectora" se entiende como una respuesta inmunitaria que proporciona un resultado significativamente mejor de una infección inducida o natural o exposición a una toxina en comparación con la de la población no inmune. La respuesta inmunitaria protectora contra toxinas principalmente está mediada por anticuerpos neutralizadores que tienen alta afinidad, por ejemplo, con una  $K_d$  menor de  $10^{-8}$  M. El efecto beneficioso de la neutralización de toxinas es la protección de las células diana y la prevención de la inflamación. También puede contribuir la formación de complejos inmunitarios mediada por Fc al retirarse la toxina de la circulación (a través de las células RES).

60 Un inmunógeno o composición inmunogénica normalmente comprende el antígeno o epítipo y un vehículo, que puede comprender específicamente un adyuvante. El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que, cuando se administra junto con un antígeno, aumenta y/o redirige la respuesta inmunitaria al antígeno, pero cuando se administra solo no genera una respuesta inmunitaria al antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmunitaria por varios mecanismos incluyendo el reclutamiento de linfocitos, la estimulación de linfocitos B y/o T, y la estimulación de macrófagos. Son ejemplos de vehículos los liposomas o péptidos catiónicos; son ejemplos de adyuvantes el fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio, MF59 u oligonucleótidos CpG.

65 El término "aislado" o "aislamiento", como se usa en el presente documento con respecto a un ácido nucleico, un anticuerpo u otro compuesto, hará referencia a un compuesto que se ha separado suficientemente del medio con el

que estaría asociado de manera natural, de forma que existe en forma "sustancialmente pura". "Aislado" no significa necesariamente la exclusión de mezclas artificiales o sintéticas con otros compuestos o materiales, o la presencia de impurezas que no interfieren con la actividad fundamental, y que pueden estar presentes, por ejemplo, debido a una purificación incompleta. En particular, también se entiende que las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención incluyen las sintetizadas químicamente.

Con respecto a los ácidos nucleicos de la invención, algunas veces se usa la expresión "ácido nucleico aislado". Esta expresión, cuando se aplica al ADN, se refiere a una molécula de ADN que está separada de las secuencias con las que está inmediatamente contigua en el genoma natural del organismo en el que se produjo. Por ejemplo, un "ácido nucleico aislado" puede comprender una molécula de ADN insertada en un vector, tal como un plásmido o un vector viral, o integrada en el ADN genómico de una célula u organismo procariota o eucariota. Cuando se aplica al ARN, la expresión "ácido nucleico aislado" se refiere principalmente a una molécula de ARN codificada por una molécula de ADN aislada como se ha definido anteriormente. Como alternativa, la expresión puede hacer referencia a una molécula de ARN que se ha separado suficientemente de otros ácidos nucleicos con los que estaría asociado en su estado natural (es decir, en células o tejidos). Un "ácido nucleico aislado" (ADN o ARN) puede representar además una molécula producida directamente por medios biológicos o sintéticos y separada de otros componentes presentes durante su producción.

Con respecto a polipéptidos o proteínas, tales como anticuerpos o epítomos de la invención, el término "aislado" hará referencia específicamente a compuestos que carecen o carecen sustancialmente de material con el que están asociados naturalmente, tales como otros compuestos con los que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el que se preparan (por ejemplo, cultivo celular) cuando dicha preparación es por la tecnología de ADN recombinante realizada *in vitro* o *in vivo*. Los compuestos aislados pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y, para fines prácticos, pueden aislarse - por ejemplo, los polipéptidos o polinucleótidos pueden mezclarse con vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables cuando se usan en diagnóstico o terapia.

El término "neutralización" se usa en el presente documento en su sentido más amplio y se refiere a cualquier molécula que inhibe que un patógeno, tal como *S. aureus* infecte a un sujeto, o que inhibe que el patógeno promueva infecciones mediante la producción de potentes toxinas proteicas, o que inhibe que las toxinas dañen a una célula diana en un sujeto, independientemente del mecanismo mediante el que se consigue la neutralización. La neutralización puede conseguirse, por ejemplo, por un anticuerpo que inhibe la unión y/o interacción de la toxina o toxinas de *S. aureus* con su receptor afin en células diana. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden neutralizar la actividad de la toxina, reduciéndose o eliminándose los efectos *in vivo* o *in vitro* de la interacción entre la toxina y la célula diana, tal como glóbulos rojos. La neutralización puede realizarse adicionalmente mediante la inhibición de la formación de la toxina activa, por ejemplo, en el caso de las citolisinas de dos componentes de *S. aureus*, mediante la inhibición de la unión de los componentes L y R o la formación de los poros oligoméricos en citomembranas.

La potencia de neutralización de anticuerpos contra toxinas citolíticas típicamente se determina en un ensayo convencional midiendo la mayor viabilidad o funcionalidad de células susceptibles a la toxina dada. La neutralización puede expresarse por el porcentaje de células viables con y sin anticuerpos. En el caso de anticuerpos muy potentes, una forma preferida para expresar la potencia de neutralización es la relación molar anticuerpo:toxina, donde los valores inferiores corresponden a una mayor potencia. Los valores inferiores a 1 definen una potencia muy alta.

La expresión "neutralización cruzada", como se usa en el presente documento, hará referencia a la neutralización de varias toxinas, por ejemplo, toxinas que incorporan un epítomo de reacción cruzada reconocido por el anticuerpo de reacción cruzada o poliespecífico.

La expresión "*Staphylococcus aureus*" o "*S. aureus*" o "*S. aureus* patogénico" se entiende de la siguiente manera. Las bacterias *Staphylococcus aureus* normalmente se encuentran en la piel de personas y animales. Las bacterias generalmente son inocuas, a menos que entren en el cuerpo a través de un corte u otra herida. Típicamente, las infecciones son problemas cutáneos de poca importancia en las personas sanas. Históricamente, las infecciones se trataban con antibióticos de amplio espectro, tales como metilina. Sin embargo, ahora han aparecido ciertas cepas que son resistentes a metilina y otros antibióticos betalactámicos, tales como penicilina y cefalosporinas. Estos se conocen como *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (también conocidos como *Staphylococcus aureus* con resistencia multifármaco, o "MRSA").

*Staphylococcus aureus*, un importante patógeno humano, expresa una multitud de toxinas de secreción (exotoxinas). Puede atacar a diversos tipos de células hospedadoras, entre los que se incluyen eritrocitos, granulocitos neutrófilos y otras células inmunitarias, así como células epiteliales del pulmón o la piel. Un miembro importante de las toxinas de *S. aureus* es la hemolisina alfa (Hla), que ejerce función citolítica sobre los linfocitos, macrófagos, células epiteliales del pulmón y células endoteliales pulmonares.

Las infecciones por *S. aureus*, incluyendo MRSA, generalmente comienzan como pequeños abultamientos de color rojo que parecen granos, furúnculos o picaduras de araña. Estos abultamientos o manchas pueden convertirse rápidamente en abscesos profundos, dolorosos que requieren drenaje quirúrgico. Algunas veces, las bacterias permanecen confinadas en la piel. En ocasiones, pueden excavar e introducirse en el interior del cuerpo, produciendo

infecciones que podrían poner en peligro la vida en una amplia gama de tejidos humanos, incluyendo piel, tejido blando, huesos, articulaciones, heridas quirúrgicas, el torrente sanguíneo, válvulas cardíacas, pulmones, u otros órganos. Por lo tanto, las infecciones por *S. aureus* pueden producir enfermedades asociadas dicha bacteria, que son enfermedades potencialmente fatales, tales como fascitis necrotizante, endocarditis septicemia, síndrome de choque tóxico, y diversas formas de neumonía, incluyendo neumonía necrotizante, y la producción de toxinas en furunculosis y carbunculosis. La infección por MRSA es especialmente problemática en situaciones hospitalarias o en residencias de ancianos en las que los pacientes tienen riesgo o son propensos a tener heridas abiertas, hay dispositivos invasivos, y sistemas inmunitarios debilitados y, por lo tanto, tienen mayor riesgo de infección que el público general.

Los anticuerpos neutralizadores de las toxinas de *S. aureus* interfieren con los patógenos y reacciones patogénicas, y por lo tanto pueden limitar o prevenir la infección y/o mejorar una afección debida a dicha infección, o inhibir la patogénesis de *S. aureus*, en particular, la patogénesis de la neumonía. A este respecto, en el presente documento los "anticuerpos protectores" se consideran anticuerpos neutralizadores que son responsables de la inmunidad frente a un agente infeccioso observado en inmunidad activa o pasiva. En particular, los anticuerpos protectores, como se describen en el presente documento, pueden neutralizar los efectos tóxicos (tales como citólisis, inducción de la expresión de citocinas proinflamatorias por células diana) de factores de virulencia secretados (exotoxinas) y, por lo tanto, interferir con el potencial patógeno de *S. aureus*.

El término "recombinante", como se usa en el presente documento, significará "que se ha preparado por o es el resultado de ingeniería genética". Un hospedador recombinante comprende específicamente un vector de expresión o vector de clonación, o se ha modificado por ingeniería genética de manera que contiene una secuencia de ácido nucleico recombinante, en particular, que emplea una secuencia de nucleótidos extraña para el hospedador. Una proteína recombinante se produce expresando un ácido nucleico recombinante respectivo en un hospedador. La expresión "anticuerpo recombinante", tal como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados a partir de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humanos o un hibridoma preparado a partir del mismo, (b) anticuerpos aislados a partir de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos recombinantes comprenden anticuerpos modificados por ingeniería genética para incluir transposiciones y mutaciones que se producen, por ejemplo, durante la maduración de anticuerpos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "especificidad" o "unión específica" se refiere a una reacción de unión que es determinativa del ligando afín de interés en una población heterogénea de moléculas. Por lo tanto, en las condiciones indicadas (p. ej., condiciones de inmunoensayo), un anticuerpo se une específicamente a su diana particular y no se une en una cantidad significativa a otras moléculas presentes en una muestra. La unión específica significa que la unión es selectiva en términos de identidad de la diana, afinidad de unión o avidéz alta, media o baja, según se seleccione. La unión selectiva normalmente se consigue si la unión constante o la dinámica de unión es, al menos, 10 veces diferente, preferentemente, la diferencia es de al menos 100 veces y, más preferentemente, al menos 1.000 veces.

El término también es aplicable cuando, por ejemplo, un anticuerpo es específico para un epítipo particular que presenta reacción cruzada con varios antígenos, en cuyo caso el anticuerpo específico podrá unirse a los diversos antígenos que llevan el epítipo de reacción cruzada. Dicho sitio de unión de un anticuerpo o un anticuerpo con especificidad para unirse a un epítipo de reacción cruzada también se denomina sitio y anticuerpo de unión poliespecífica o de unión específica cruzada, respectivamente. Por ejemplo, un anticuerpo puede tener un sitio de unión poliespecífico que se une específicamente a un epítipo con reacción cruzada con varios antígenos diferentes con homología de secuencia dentro del epítipo y/o similitudes estructurales para proporcionar un epítipo conformacional de esencialmente la misma estructura, por ejemplo, de reacción cruzada con al menos la toxina Hla y una toxina de dos componentes de *S. aureus*.

La inmunoespecificidad de un anticuerpo, su capacidad de unión y la afinidad relacionada que presenta el anticuerpo por una secuencia de unión de reacción cruzada, se determinan por una secuencia de unión de reacción cruzada con la que inmunorreacciona (se une) el anticuerpo. La especificidad de la secuencia de unión con reacción cruzada puede definirse, al menos en parte, por los restos de aminoácido de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo inmunoglobulina y/o por la secuencia de restos de aminoácidos de la región variable de cadena ligera.

El uso de las expresiones "que tiene la misma especificidad", "que tiene el mismo sitio de unión" o "que se une al mismo epítipo" indica que anticuerpos monoclonales equivalentes presentan las mismas o esencialmente las mismas características de inmunorreacción (unión), es decir, similares y compiten por la unión a una secuencia de unión a la diana preseleccionada. La especificidad relativa de una molécula de anticuerpo para una diana particular puede determinarse relativamente por ensayos de competición, por ejemplo, como se describe en Harlow, *et al.*, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988).

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, hará referencia a un mamífero de sangre caliente, particularmente un ser humano o un animal no humano. MRSA es un patógeno humano críticamente importante que también preocupa cada vez más en la medicina veterinaria. Está presente en una amplia serie de especies animales no humanas. Por lo tanto, el término "sujeto" también puede referirse particularmente a animales, incluyendo perros, gatos, conejos, caballos, ganado bovino, cerdos y aves de corral. En particular, el uso médico de la invención o el método de tratamiento respectivo se aplica a un sujeto que necesita profilaxis o tratamiento de una patología asociada con la infección por *S. aureus*. El sujeto puede ser un paciente con riesgo de infección por *S. aureus* o que padece la enfermedad, incluyendo la primera fase o una fase avanzada de la enfermedad. El término "paciente" incluye seres humanos y otros sujetos mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico. Por lo tanto, se entiende que el término "tratamiento" incluye el tratamiento tanto profiláctico como terapéutico.

Un sujeto, por ejemplo, se trata para la profilaxis o terapia de *S. aureus*. En particular, se trata un sujeto, que tiene riesgo de infección o que desarrolla dicha enfermedad o la recurrencia de la enfermedad, o un sujeto que padece dicha infección y/o la enfermedad asociada con dicha infección.

Específicamente, el término "profilaxis" se refiere a medidas preventivas que se pretende que incluyan la prevención del inicio de la patogénesis o medidas profilácticas para reducir el riesgo de patogénesis.

Específicamente, el método para tratar, prevenir, o retrasar una patología en un sujeto como se describe en el presente documento, se realiza por interferencia con la patogénesis de *S. aureus* como agente causal de la afección, donde la patogénesis incluye una etapa para formar un poro en la membrana celular del sujeto, por ejemplo, por los factores de virulencia o toxinas específicas.

El término "toxina", como se usa en el presente documento hará referencia a la toxina alfa (Hla) y a las toxinas de dos componentes de *S. aureus*.

La virulencia de *S. aureus* se debe a una combinación de numerosos factores de virulencia, que incluyen proteínas asociadas a la superficie que permiten que la bacteria se adhiera a membranas celulares eucariotas, un polisacárido capsular que la protege de la opsonofagocitosis, y varias exotoxinas. *S. aureus* produce enfermedades principalmente mediante la producción de factores de virulencia secretados tales como hemolisinas, enterotoxinas y toxina del síndrome del choque tóxico. Estos factores de virulencia secretados reprimen la respuesta inmunitaria inactivando muchos mecanismos inmunológicos en el hospedador, y producen la destrucción de tejidos y ayudan a establecer la infección. Esto último se consigue por un grupo de toxinas formadoras de poros, de las que la más importante es Hla, un factor de virulencia clave para la neumonía por *S. aureus*.

*S. aureus* produce una serie diversa de factores de virulencia adicionales y toxinas que permiten que esta bacteria neutralice y soporte el ataque por diferentes tipos de células inmunitarias, específicamente subpoblaciones de glóbulos blancos que constituyen el sistema de defensa principal del cuerpo. La producción de estos factores de virulencia y toxinas permite que *S. aureus* mantenga un estado infeccioso. Entre estos factores de virulencia, *S. aureus* produce varias leucotoxinas de dos componentes, que dañan a las membranas de las células de defensa del hospedador y los eritrocitos por la acción sinérgica de dos proteínas o subunidades no asociadas. Entre estas toxinas de dos componentes, la hemolisina gamma (HlgAB y HlgCB) y la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) son las mejor caracterizadas.

La toxicidad de las leucocidinas hacia las células de mamífero implica la acción de dos componentes. La primera subunidad se denomina componente de clase L, y la segunda subunidad se denomina componente de clase R. Las subunidades L y R actúan sinérgicamente formando poros en los glóbulos blancos, incluyendo los monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos (conocidos colectivamente como fagocitos). Se sabe que el repertorio de leucotoxinas de dos componentes producidas por *S. aureus* incluye pares afines y no afines de los componentes R y L, por ejemplo, hemolisinas gamma, toxinas PVL y toxinas de tipo PVL, incluyendo HlgAB, HlgCB, LukSF, LukED, LukGH, LukS-HlgB, LukSD, HlgA-LukD, HlgA-LukF, LukG-HlgA, LukEF, LukE-HlgB, HlgC-LukD o HlgC-LukF, que son dianas preferidas como se describe en el presente documento. La Figura 1 proporciona una visión general de algunas toxinas importantes de dos componentes.

La expresión "sustancialmente puro" o "purificado", como se usa en el presente documento, hará referencia a una preparación que comprende al menos un 50% (p/p), preferentemente al menos un 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de un compuesto, tal como una molécula de ácido nucleico o un anticuerpo. La pureza se mide por métodos apropiados para el compuesto (por ejemplo, métodos cromatográficos, electroforesis en gel de poliacrilamida, análisis por HPLC, y similares).

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", usada en el presente documento indistintamente con cualquiera de los términos "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" de un compuesto, por ejemplo, un anticuerpo o inmunógeno de la presente invención, es una cantidad o actividad suficiente cuando se administra al sujeto, para producir resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos, y, como tal, una cantidad eficaz o un sinónimo de la misma depende del contexto en el que se aplica.



Una cantidad eficaz pretende significar la cantidad de un compuesto que es suficiente para tratar, prevenir o inhibir dicha enfermedad o trastorno. En el contexto de una enfermedad, se usan específicamente cantidades terapéuticamente eficaces del anticuerpo como se describe en el presente documento para tratar, modular, atenuar, invertir, o afectar a una enfermedad o afección que se beneficia de la inhibición de *S. aureus* o de la patogénesis de *S. aureus*.

La cantidad del compuesto que corresponderá a dicha cantidad eficaz variará dependiendo de varios factores, tales como el fármaco o compuesto dado, la formulación farmacéutica, la vía de administración, el tipo de enfermedad o trastorno, la identidad del sujeto u hospedador que se esté tratando, y similares, pero en cualquier caso se puede determinar de manera rutinaria por una persona experta en la materia.

El anticuerpo o el inmunógeno de la presente invención puede usarse profilácticamente para inhibir el inicio de la infección por *S. aureus*, o terapéuticamente para tratar la infección por *S. aureus*, particularmente infecciones por *S. aureus* tales como MRSA que sabe que son refractarias o en el caso de un sujeto específico que ha resultado ser refractario al tratamiento con otra terapia de antibióticos convencional.

Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo como se describe en el presente documento, tal como la proporcionada a un paciente humano que lo necesita, puede estar específicamente en el intervalo de 0,5-500 mg, preferentemente de 1-400 mg, incluso más preferiblemente hasta 300 mg, hasta 200 mg, hasta 100 mg o hasta 10 mg, aunque pueden indicarse dosis mayores, por ejemplo, para tratar patologías agudas.

Además, un régimen de tratamiento o prevención de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la presente invención puede consistir en una sola administración, o, como alternativa, comprende una serie de aplicaciones. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse al menos una vez al año, al menos una vez cada seis meses o al menos una vez al mes. Sin embargo, en otra realización, el anticuerpo puede administrarse al sujeto desde aproximadamente una vez por semana a aproximadamente una administración diaria para un tratamiento dado. La duración del periodo de tratamiento depende de una diversidad de factores, tales como la gravedad de la enfermedad, si la enfermedad es aguda o crónica, la edad del paciente, la concentración y la actividad del formato de anticuerpo. También se apreciará que la dosificación eficaz usada para el tratamiento o profilaxis puede aumentar o disminuir durante el transcurso de un régimen de tratamiento o profilaxis particular. Pueden realizarse cambios en la dosificación y estos se harán evidentes por ensayos de diagnóstico convencionales conocidos en la técnica. En algunos casos, puede necesitarse una administración crónica.

Una cantidad eficaz de un inmunógeno como se describe en el presente documento, tal como la proporcionada a un paciente con riesgo de desarrollar una patología asociada con una infección por *S. aureus*, puede estar específicamente en el intervalo de 1-15 mg/kg por dosis.

Por ejemplo, el inmunógeno puede administrarse como una primera dosis seguida por una o más dosis de refuerzo, dentro de un cierto intervalo de tiempo, de acuerdo con un esquema de inmunización de sensibilización-refuerzo para inducir una respuesta inmunitaria eficaz de larga duración frente a la infección por *S. aureus*. Un programa de vacunación preferido incluiría la administración de tres dosis, por ejemplo, una primera dosis el día 0, una segunda dosis el día 5-40, y una tercera dosis el día 10-100, preferentemente los días 0, 28 y 90. De acuerdo con un programa acelerado preferido, la administración puede realizarse los días 0, 7 y 14. Los programas acelerados pueden estar indicados para profilaxis, por ejemplo, para pacientes que se enfrentan a una cirugía optativa. Normalmente se usa alumbre como adyuvante, por ejemplo, en forma de fosfato o hidróxido.

Por lo tanto, la invención se refiere específicamente a anticuerpos monoclonales con neutralización cruzada tanto de la toxina hemolisina alfa como de las toxinas de dos componentes de *S. aureus* con una homología de secuencia del 20-28%. Esto fue sorprendente debido al bajo nivel de homología de secuencia. La probabilidad de generar mAb con neutralización cruzada de Hla y al menos una toxina de dos componentes supuestamente era baja.

Aunque sigue sin esclarecerse el modo de acción detallado, los datos obtenidos para #AB-24 (#9028) tienen un gran valor potencial y proporcionan la primera prueba de concepto de un solo anticuerpo que neutraliza tanto la hemolisina alfa como múltiples toxinas de dos componentes.

La única publicación que describe anticuerpos de especificidad múltiple por dos componentes (Laventie, PNAS, 2011:16404) se considera no relevante para la presente invención, ya que la especificidad dual por LukS y HlgC se generó diseñando un anticuerpo biespecífico que utilizaba dos sitios de unión diferentes. Por el contrario, la presente invención se refiere al mismo sitio de unión que puede unirse a las diferentes toxinas, por ejemplo, cuatro toxinas diferentes: toxina alfa y componentes R de la hemolisina gamma, la leucocidina de Pantón Valentine (PVL, LukSF) y LukED. Es factible que el mAb de reactividad cuádruple también se una a la leucocidina LukM bovina basándose en la elevada homología de aminoácidos con respecto a LukED y LukSF.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención que reconocen un epítipo en Hla y presentan reacción cruzada con HlgA, pueden tener una reactividad cruzada adicional con otros compuestos de leucocidina S de estafilococos tales como HlgC, LukS-PVL, LukHLukS-I, LukE, LukEv, y LukM. Del mismo modo, en algunas

realizaciones, los anticuerpos de la invención que reconocen un epítipo en Hla y presentan reacción cruzada con HlgB, pueden tener además reactividad cruzada con otros compuestos de leucocidina R de estafilococos tales como LukF'-PV, LukF-PV, LukDv, LukD, LukF-I, y LukG. Los anticuerpos anti-HlgA y/o anti-HlgB con reacción cruzada pueden inhibir o reducir la actividad de HlgA y la actividad de HlgB, respectivamente. En algunas realizaciones, los anticuerpos con reacción cruzada anti-HlgA y/o anti-HlgB neutralizan, por ejemplo, eliminan sustancialmente, la actividad de HlgA y HlgB, respectivamente.

De acuerdo con un aspecto específico, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo, incluyendo dicho término variantes que se unen a esencialmente el mismo epítipo, que el anticuerpo denominado #AB-24, o que comprenden el mismo sitio de unión, incluyendo dicho término variantes que comprenden esencialmente el mismo sitio de unión, que el anticuerpo denominado #AB-24. El anticuerpo #AB-24 y las variantes funcionalmente activas podrían comprender particularmente un sitio de unión que podría neutralizar Hla y presentar neutralización cruzada con al menos uno de, al menos dos o al menos los tres pares de toxinas afines LukS-LukF, LukE-LukD, y HlgB-HlgC, y posiblemente además toxinas de dos componentes.

Se dice que los anticuerpos "se unen al mismo epítipo" o "comprenden el mismo sitio de unión" o tienen "esencialmente las mismas características de unión", si los anticuerpos compiten de forma cruzada de manera que solo un anticuerpo puede unirse al epítipo en un punto de tiempo dado, es decir, un anticuerpo impide la unión o el efecto de modulación del otro.

La expresión "compite" o "compite de forma cruzada", como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, significa que un primer anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, se une a un epítipo de una manera suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, de tal forma que el resultado de la unión del primer anticuerpo con su epítipo aún se reduce de manera detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. Puede ocurrir la alternativa, en la que la unión del segundo anticuerpo a su epítipo también se reduce de manera detectable en presencia del primer anticuerpo, pero esto no ocurre necesariamente. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítipo sin que el segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su epítipo respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de manera detectable la unión del otro anticuerpo con su epítipo afín, ya sea en una medida igual, mayor o menor, se dice que los anticuerpos "compiten de forma cruzada" entre sí por la unión de su epítipo o epítipos respectivos. La presente invención incluye anticuerpos tanto competitivos como de competición cruzada.

Competición en el presente documento significa una inhibición relativa mayor de aproximadamente un 30%, como se determina por un análisis ELISA de competición, por ejemplo, como se describe en la sección de Ejemplos. Puede ser deseable establecer un mayor umbral de inhibición relativa cuyo criterio es un nivel adecuado de competición en un contexto particular, por ejemplo, cuando el análisis de competición se usa para seleccionar o explorar nuevos anticuerpos diseñados con la función deseada de la unión de toxinas adicionales de *S. aureus*. Por lo tanto, por ejemplo, es posible establecer criterios para la unión competitiva, en los que se detecta al menos un 40% de inhibición relativa, o al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o incluso al menos un 100%, antes de considerar un anticuerpo suficientemente competitivo.

Específicamente, se proporciona un anticuerpo que comprende la región variable del anticuerpo denominado #AB-24, en particular al menos una de las secuencias de CDR, preferentemente al menos dos, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos seis de las secuencias de CDR, o variantes de CDR de las mismas que son funcionalmente activas. Más específicamente, se proporciona el anticuerpo denominado #AB-24.

Específicamente, empleando el material depositado, puede producirse el anticuerpo #AB-24 o cualquier variante funcionalmente activa del mismo, tal como uno o los dos plásmidos depositados y/o una o las dos células hospedadoras depositadas.

De acuerdo con un aspecto específico, el anticuerpo puede proceder de un anticuerpo codificado por el plásmido de la invención, por ejemplo, empleando una secuencia parcial del material depositado para producir por ingeniería genética el anticuerpo #AB-24 o cualquier variante funcionalmente activa del mismo.

De acuerdo con otro aspecto específico, el anticuerpo #AB-24 o cualquier variante funcionalmente activa del mismo puede proceder de un anticuerpo producido por una célula hospedadora depositada con el número de referencia DSM 26747 y/o DSM 26748, por ejemplo, empleando una secuencia parcial del material depositado para obtener por ingeniería genética el anticuerpo #AB-24 o cualquier variante funcionalmente activa del mismo.

Específicamente, la variante de #AB-24 es una variante de CDR que es funcionalmente activa, por ejemplo, con alteraciones paralelas en al menos una de las secuencias de CDR.

En ciertos aspectos, la invención proporciona dichos anticuerpos variantes, preferentemente anticuerpos monoclonales, más preferentemente anticuerpos humanos, que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, donde cualquiera de la cadena pesada o región variable de VH o las CDR respectivas comprende una secuencia de aminoácidos procedente del plásmido depositado respectivo y/o de la célula hospedadora depositada respectiva.

5 En ciertos aspectos, la invención proporciona dichos anticuerpos variantes, preferentemente anticuerpos monoclonales, más preferentemente anticuerpos humanos, que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, donde cualquiera de la cadena ligera o región variable de VL o las CDR respectivas comprende una secuencia de aminoácidos procedente del plásmido depositado respectivo y/o de la célula hospedadora depositada respectiva.

10 En ciertos aspectos, la invención proporciona dichos anticuerpos variantes, preferentemente anticuerpos monoclonales, más preferentemente anticuerpos humanos, que comprenden un cadena pesada y una cadena ligera, donde cualquiera de la cadena pesada y ligera, o las regiones variables de VH/VL, o las CDR respectivas comprende una secuencia de aminoácidos procedente de los plásmidos depositados respectivos y/o de las células hospedadoras depositadas respectivas.

15 En ciertos aspectos, la invención proporciona también dichos anticuerpos variantes, que comprenden las secuencias de unión respectivas, tales como las secuencias variables y/o las secuencias de CDR, procedentes del material depositado, donde las secuencias de unión comprenden una secuencia que tiene al menos un 70%, o al menos un 80%, o al menos un 90%, o al menos un 95%, o al menos un 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos procedente del material depositado, y donde la variante es una variante funcionalmente activa.

20 Como se describe en el presente documento, en un aspecto, la invención proporciona moléculas de anticuerpo caracterizadas por, por ejemplo, la capacidad de competir con el anticuerpo monoclonal #AB-24 por la unión a Hla, LukSF, LukED y HigCB. #AB-24 es un anticuerpo IgG1 humano, que aislaron y caracterizaron los inventores. La cadena variable pesada madura de #AB-24 se produce, por ejemplo, empleando la célula hospedadora de DSM 26747. La cadena variable ligera madura de #AB-24 se produce, por ejemplo, empleando la célula hospedadora de DSM 26748.

25 Son anticuerpos preferidos de la invención los que se unen a dichos antígenos individuales con alta afinidad, en particular con una constante de asociación alta y/o de disociación baja, o una aidez alta por la unión. La afinidad de unión de un anticuerpo normalmente se caracteriza en términos de la concentración del anticuerpo a la cual están ocupados la mitad de los sitios de unión a antígeno, conocida como la constante de disociación ( $K_d$ , o  $K_D$ ). Normalmente, un agente de unión se considera un agente de unión de alta afinidad con una  $K_d < 10^{-8}$  M, preferentemente una  $K_d < 10^{-9}$  M y incluso más preferida una  $K_d < 10^{-10}$  M.

30 Además, en una realización particularmente preferida, las afinidades de unión al antígeno individual son afinidades intermedias, por ejemplo, con una  $K_d$  menor de  $10^{-6}$  y de hasta  $10^{-8}$  M, por ejemplo, cuando se unen a al menos dos antígenos.

35 Pueden proporcionarse agentes de unión con afinidad intermedia de acuerdo con la invención, preferentemente junto con un proceso de maduración de la afinidad, si fuera necesario.

40 La maduración de la afinidad es el proceso mediante el cual se producen anticuerpos con mayor afinidad por un antígeno diana. Puede emplearse uno cualquiera o más métodos para preparar y/o usar bibliotecas de maduración de afinidad disponibles en la técnica para generar anticuerpos con maduración de afinidad de acuerdo con diversas realizaciones de la invención desveladas en el presente documento. Los ejemplos de dichos métodos y usos de maduración de afinidad, tales como mutagénesis aleatoria, pases de cepas de mutadores bacterianos, mutagénesis de sitio dirigido, dirección a puntos calientes mutacionales, mutagénesis parsimoniosa, reordenamiento de anticuerpos, reordenamiento de cadena ligera, reordenamiento de cadena pesada, CDR1 y/o mutagénesis de CDR1, y métodos para producir y usar bibliotecas de maduración de la afinidad que pueden utilizarse para implementar y usos de acuerdo con diversas realizaciones de la invención desvelada en el presente documento, incluyen, por ejemplo, los desvelados en: Prassler *et al.* (2009); Immunotherapy. Vol. 1(4), págs. 571-583, Sheedy *et al.* (2007), Biotechnol. Adv. Vol. 25(4), págs. 333-352, documento W02012/009568; documento W02009/036379; documento W02010/105256; documento US2002/0177170; y documento W02003/074679.

55 Con cambios estructurales de un anticuerpo, incluyendo mutagénesis de aminoácidos o como consecuencia de la mutación somática en los segmentos génicos de la inmunoglobulina, se producen variantes de un sitio de unión a un antígeno y se seleccionan las afinidades mayores. Los anticuerpos de afinidad madurada pueden exhibir una afinidad mayor que un anticuerpo parental. Los anticuerpos parentales únicos se pueden someter a maduración de la afinidad. Como alternativa, conjuntos de anticuerpos con una afinidad de unión similar al antígeno diana se pueden considerar estructuras parentales que varían para obtener anticuerpos únicos de afinidad madurada o conjuntos de dichos anticuerpos con afinidad madurada.

60 La variante de afinidad madurada preferida de un anticuerpo de acuerdo con la invención presenta un aumento en la afinidad de unión de al menos 10 veces, preferentemente un aumento de al menos 100 veces. La maduración de la afinidad se puede usar en el transcurso de las campañas de selección que usan las respectivas bibliotecas de moléculas parentales, con anticuerpos que tienen una afinidad de unión intermedia para obtener el anticuerpo de la invención que tiene la propiedad de unión a la diana específica de una afinidad de unión  $K_d < 10^{-8}$  M. Como alternativa, la afinidad puede aumentarse incluso más por maduración de la afinidad del anticuerpo de acuerdo con la invención

65

para obtener los altos valores correspondientes a una Kd menor de  $10^{-9}$  M, preferentemente menor de  $10^{-10}$  M o incluso menor de  $10^{-11}$  M, siendo lo más preferido que el valor esté en el intervalo picomolar.

5 Las células efectoras fagocíticas pueden activarse mediante otra ruta que emplea la activación del complemento. Los anticuerpos que se unen a antígenos de superficie presentes en los microorganismos atraen al primer componente de la cascada del complemento con su región Fc e inician la activación del sistema del complemento "clásico". Esto da como resultado la estimulación de células efectoras fagocíticas, que finalmente destruyen la diana por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

10 De acuerdo con una realización específica, el anticuerpo de la invención tiene una actividad citotóxica en presencia de células efectoras inmunitarias medida en un ensayo convencional de ADCC o CDC. Puede mostrarse una actividad citotóxica determinada por un ensayo de ADCC o CDC para un anticuerpo de la invención, si existe un incremento significativo en el porcentaje de la citólisis en comparación con un control. La actividad citotóxica relacionada con la ADCC o CDC se mide, preferentemente, como el incremento del porcentaje absoluto, que es, preferentemente, superior al 5%, más preferentemente, superior al 10%, incluso más preferentemente superior al 20%.

15 La invención proporciona específicamente anticuerpos de reacción cruzada, que se obtienen por un proceso que identifica anticuerpos neutralizadores con múltiples especificidades, por ejemplo, por un esquema de selección de descubrimiento de reacción cruzada. Por consiguiente, una biblioteca de anticuerpos que incluye anticuerpos que muestran reactividad con dos dianas, las dianas A y B, primero puede seleccionarse por reactividad con una de las dianas, por ejemplo, la diana A, seguido de la selección por reactividad con la otra diana, por ejemplo, la diana B. Cada vuelta de selección sucesiva refuerza la fuerza reactiva del grupo resultante hacia las dos dianas. Por consiguiente, este método es particularmente útil para identificar anticuerpos con reactividad cruzada dirigidos a las dos dianas diferentes, y el potencial para neutralizar de manera cruzada un patógeno. El método puede ampliarse para identificar anticuerpos que muestran reactividad hacia dianas adicionales, incluyendo vueltas adicionales de enriquecimiento hacia la diana o dianas adicionales.

20 Los anticuerpos con reacción cruzada, en algunos casos, se producen mediante la selección frente a antígenos individuales. Para aumentar la probabilidad de aislar clones de reactividad cruzada, se podrían aplicar múltiples presiones selectivas explorando sucesivamente frente a múltiples antígenos. Las estrategias de selección de mAb especiales emplean los diferentes componentes de toxina de una manera alternativa. Por ejemplo, los mAb anti-H1a neutralizadores más potentes después se ensayan por la unión a PVL y toxinas de tipo PVL en neutrófilos humanos, que representan la diana principal para las toxinas de dos componentes durante la infección por *S. aureus*.

25 Las toxinas recombinantes pueden usarse para seleccionar anticuerpos de una biblioteca de anticuerpos, por ejemplo, una biblioteca de anticuerpos presentados en levaduras.

30 En cualquier caso, la reactividad cruzada puede mejorarse adicionalmente por métodos de optimización de anticuerpos conocidos en la técnica. Por ejemplo, ciertas regiones de las regiones variables de las cadenas de inmunoglobulinas descritas en el presente documento pueden someterse a una o más estrategias de optimización, incluyendo reordenamiento de cadena ligera, mutagénesis destinacional, amalgamación de CDR y mutagénesis dirigida de CDR seleccionadas y/o regiones marco conservadas.

35 Los métodos de exploración para identificar anticuerpos con las propiedades de neutralización deseadas pueden ser por inhibición de la toxina que se une a las células diana, inhibición de la formación de dímeros u oligómeros. inhibición de la formación de poros, inhibición de la lisis celular, inhibición de la inducción de citocinas, linfocinas, y cualquier señalización proinflamatoria, y/o la inhibición del efecto *in vivo* en animales (muerte, hemólisis, inflamación excesiva, disfunción orgánica, La reactividad puede evaluarse basándose en la unión directa a las toxinas deseadas, por ejemplo, usando ensayos convencionales.

40 Una vez que se han identificado anticuerpos de neutralización cruzada con las propiedades deseadas, pueden determinarse el epítipo o epítipos dominantes reconocidos por los anticuerpos. En la técnica son bien conocidos métodos para la localización de epítipos y se desvelan, por ejemplo, en Epitope Mapping: A Practical Approach, Westwood and Hay, eds., Oxford University Press, 2001.

45 La localización de epítipos se refiere a la identificación del epítipo al que se une un anticuerpo. Hay muchos métodos conocidos por los expertos en la materia para determinar la localización de epítipos en proteínas, incluyendo el análisis cristalográfico del complejo de antígeno-anticuerpo, ensayos competitivos, ensayos de expresión de fragmentos de genes, y ensayos basados en péptidos sintéticos. En el presente documento, un anticuerpo que "se une al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia se entiende de la siguiente manera. Cuando dos anticuerpos reconocen epítipos que son epítipos idénticos o estéricamente solapantes, se dice que los anticuerpos se unen al mismo, esencialmente al mismo o sustancialmente al mismo epítipo. Un método usado comúnmente para determinar si dos anticuerpos se unen a epítipos idénticos o estéricamente solapantes es el ensayo de competición, que puede configurarse en varios formatos diferentes, usando antígeno marcado o anticuerpo marcado. Generalmente, un antígeno se inmoviliza en una placa de 96 pocillos, y se mide la capacidad de los anticuerpos no marcados de bloquear la unión de los anticuerpos marcados usando marcadores radiactivos o enzimáticos.

Una vez identificados los anticuerpos con las propiedades de neutralización cruzada deseadas, dichos anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos, pueden producirse por métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, técnicas de hibridoma o la tecnología de ADN recombinante.

5 En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador adecuado, tal como un hámster, se inmuniza para inducir anticuerpos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Entonces se fusionan los linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una  
10 célula de hibridoma.

El medio de cultivo en el que están creciendo las células de hibridoma se ensaya con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un  
15 ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Los anticuerpos monoclonales recombinantes pueden producirse, por ejemplo, aislando el ADN que codifica las cadenas de anticuerpo requeridas y transfectando una célula hospedadora recombinante con las secuencias codificantes para la expresión, usando vectores de expresión recombinantes bien conocidos, por ejemplo, los  
20 plásmidos de la invención o uno o más casetes de expresión que comprenden las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de anticuerpo. Las células hospedadoras recombinantes pueden ser células procariotas y eucariotas, tales como las descritas anteriormente.

De acuerdo con un aspecto específico, la secuencia de nucleótidos puede usarse para manipulación genética para humanizar el anticuerpo o mejorar la afinidad, u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante puede modificarse por ingeniería genética para parecerse más a las regiones constantes humanas para evitar la  
25 respuesta inmunitaria, si el anticuerpo se usa en ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Puede ser deseable manipular genéticamente la secuencia de anticuerpos para obtener mayor afinidad por las toxinas diana y mayor eficacia contra *S. aureus*. Será evidente para un experto en la materia que pueden realizarse uno o más cambios de polinucleótidos en el anticuerpo mientras se mantiene su capacidad de unión a las toxinas diana.  
30

La producción de moléculas de anticuerpo, por diversos medios, generalmente se entiende bien. La patente de Estados Unidos 6331415 (Cabilly *et al.*), por ejemplo, describe un método para la producción recombinante de anticuerpos donde las cadenas pesada y ligera se expresan simultáneamente a partir de un solo vector o a partir de  
35 dos vectores distintos en una sola célula. Wibbenmeyer *et al.*, (1999, Biochim Biophys Acta 1430(2):191 -202) y Lee and Kwak (2003, J. Biotechnology 101 :189-198) describen la producción de anticuerpos monoclonales a partir de cadenas pesadas y ligeras producidas por separado, usando plásmidos expresados en cultivos separados de *E. coli*. Se proporcionan otras diversas técnicas relevantes para la producción de anticuerpos, por ejemplo, Harlow, *et al.*, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988).  
40

Si se desea, el anticuerpo de la invención, por ejemplo, el anticuerpo #AB-24 puede secuenciarse y la secuencia polinucleotídica después puede clonarse en un vector para la expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo puede mantenerse en el vector en una célula hospedadora y la célula hospedadora después puede expandirse y congelarse para un uso futuro. La producción de anticuerpos monoclonales en cultivo celular puede  
45 realizarse mediante la clonación de genes de anticuerpo procedentes de linfocitos B por medios conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica la producción del anticuerpo recombinante de la presente invención.  
50

En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica la producción del epítipo recombinante de la presente invención, o una molécula que comprende dicho epítipo de la presente invención. Sin embargo, el epítipo de la invención también puede producirse de manera sintética, por ejemplo, mediante cualquiera de los métodos de síntesis bien conocidos en la técnica.  
55

Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o epítipo puede tener cualquier característica adecuada y comprender cualquier rasgo adecuado o combinaciones de los mismos. Por lo tanto, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o epítipo puede estar en forma de ADN, ARN, o un híbrido de los mismos, y puede incluir bases no naturales, una cadena principal modificada, por ejemplo, una cadena principal de fosforotioato que promueve la  
60 estabilidad del ácido nucleico, o ambas cosas. El ácido nucleico ventajosamente puede incorporarse en un casete de expresión, vector o plásmido de la invención, que comprende características que promueven la expresión deseada, replicación, y/o selección en la célula hospedadora diana. Los ejemplos de dichas características incluyen un componente de origen de replicación, un componente de gen de selección, un componente de promotor, un componente de elemento potenciador, un componente de secuencia de poliadenilación, un componente de  
65 terminación, y similares, conociéndose numerosos ejemplos adecuados.

La presente divulgación proporciona además las construcciones de ADN recombinante que comprenden una o más de las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento. Estas construcciones recombinantes se usan en relación con un vector, tal como un plásmido, fagémido, fago o vector viral, en el que se inserta una molécula de ADN que codifica cualquier anticuerpo desvelado.

Los anticuerpos monoclonales se producen usando cualquier método que produce moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Los ejemplos de métodos adecuados para preparar anticuerpos monoclonales incluyen los métodos de hibridoma de Kohler *et al.* (1975, Nature 256:495-497) y el método de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor, 1984, J. Immunol. 133:3001; y Brodeur *et al.*, 1987, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York), págs. 51-63.

La invención además proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o un inmunógeno como se describe en el presente documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse de acuerdo con la presente invención como una inyección en embolada o infusión o por infusión continua. En la técnica son bien conocidos vehículos farmacéuticos adecuados para facilitar dichos medios de administración.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables generalmente incluyen todos y cada uno de los disolventes adecuados, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles con un anticuerpo o composición relacionada o combinación proporcionada por la invención. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen agua estéril, suero salino, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, y similares, así como combinaciones de cualquiera de los mismos.

En un aspecto similar, un anticuerpo puede combinarse con uno o más vehículos apropiados para una vía de administración deseada, los anticuerpos pueden, por ejemplo, mezclarse con cualquiera de lactosa, sacarosa, almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácido fosfórico y sulfúrico, goma arábica, gelatina, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, y opcionalmente además comprimirse o encapsularse para la administración convencional. Como alternativa, un anticuerpo puede disolverse en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, soluciones coloidales de carboximetil celulosa, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma de tragacanto, y/o diversos tampones. Otros vehículos, adyuvantes, y modos de administración son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas. Un vehículo puede incluir un material de liberación controlada o un material de retardo en el tiempo, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica.

En la técnica se conocen otros vehículos farmacéuticamente aceptables y se describen en, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES. Las formulaciones líquidas pueden ser soluciones, emulsiones o suspensiones y pueden incluir excipientes tales como agentes de suspensión, solubilizantes, tensioactivos, conservantes, y agentes quelantes.

Se contemplan composiciones farmacéuticas en las que se formulan un anticuerpo o inmunógeno de la presente invención y uno o más agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones estables del anticuerpo o inmunógeno de la presente invención se preparan para el almacenamiento mezclando dicha inmunoglobulina que tiene el grado deseado de pureza con vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales, excipientes o estabilizantes, en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* son, específicamente, estériles, preferentemente en forma de una solución acuosa estéril. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos. El anticuerpo y otros agentes terapéuticamente activos divulgados en el presente documento también se pueden formular como inmunoliposomas, y/o encerrarse en microcápsulas.

La administración de la composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o inmunógeno de la presente invención, puede realizarse de varios modos, incluyendo por vía oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, intraótica, transdérmica, mucosa, por vía tópica, por ejemplo, geles, salvas, lociones, cremas, etc., por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía intrapulmonar, por ejemplo, empleando una tecnología inhalable o sistemas de liberación pulmonar, por vía vaginal, por vía parenteral, por vía rectal, o intraocular.

Las formulaciones ejemplares usadas para administración parenteral incluyen las adecuadas para inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa tales como, por ejemplo, una solución estéril, emulsión o suspensión.

En una realización, el anticuerpo o inmunógeno de la presente invención es el único agente terapéuticamente activo administrado a un sujeto, por ejemplo, como una monoterapia para modificar o prevenir la enfermedad.

Como alternativa, el anticuerpo o inmunógeno de la presente invención se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos o profilácticos distintos, incluyendo, pero sin limitación, tratamientos convencionales, por ejemplo

antibióticos, inhibidores de la inflamación esteroideos y no esteroideos, y/u otra terapia basada en anticuerpos, por ejemplo, empleando agentes antibacterianos o antiinflamatorios.

5 Una terapia de combinación emplea particularmente un régimen convencional, por ejemplo, como el usado para tratar la infección por MRSA. Este puede incluir antibióticos, por ejemplo, tigeciclina, linezolid, metilicina y/o vancomicina.

En una terapia combinada, el anticuerpo puede administrarse como una mezcla, o concomitantemente con uno o más regímenes terapéuticos distintos, por ejemplo, antes, simultáneamente o después de la terapia concomitante.

10 En algunos casos, la administración profiláctica de inmunógenos puede emplear una vacuna que comprende el inmunógeno de la presente invención, es decir, una vacuna monovalente. Sin embargo, puede usarse una vacuna multivalente que comprende diferentes inmunógenos para inducir una respuesta inmunitaria contra el mismo o diferentes patógenos diana.

15 Las propiedades biológicas del anticuerpo, el inmunógeno o las preparaciones farmacéuticas respectivas de la invención puede caracterizarse *ex vivo* en experimentos en células, tejidos y organismos enteros. Como se conoce en la técnica, los fármacos a menudo se analizan *in vivo* en animales, incluyendo, entre otros, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos, y monos, con el fin de medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento contra una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética de un fármaco, la farmacodinámica, la toxicidad, y otras propiedades. Se puede hacer referencia a los animales como modelos de enfermedad. A menudo, los agentes terapéuticos se prueban en ratones, incluyendo, entre otros, ratones atímicos, ratones SCID, ratones con xenoinjertos, y ratones transgénicos (incluyendo activados e inactivados). Dicha experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial del anticuerpo a usar como agente terapéutico o profiláctico con la semivida, función efectora, actividad de neutralización cruzada y/o respuesta inmunitaria tras una inmunoterapia activa o pasiva, adecuadas. Cualquier organismo, preferentemente mamíferos, se puede usar para las pruebas. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los seres humanos, primates, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados y por tanto, se pueden usar para probar la eficacia, la toxicidad, la farmacocinética, la farmacodinámica, la semivida, u otra propiedad del agente o composición objeto de la invención. Finalmente se requieren pruebas en seres humanos para la aprobación como fármacos y, por tanto, por supuesto, se contemplan estos experimentos. Por lo tanto, el anticuerpo, inmunógeno y composiciones farmacéuticas respectivas de la presente invención pueden probarse en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica o profiláctica, la toxicidad, la inmunogenicidad, la farmacocinética, y/u otras propiedades clínicas.

35 La invención también proporciona el anticuerpo objeto de la presente invención para fines de diagnóstico, por ejemplo, para su uso en métodos para detectar y determinar cuantitativamente la concentración de una toxina o anticuerpo como inmunorreactivo o diana en una muestra de fluido biológico.

40 La invención también proporciona métodos para detectar el nivel de toxinas o infección por *S. aureus* en una muestra biológica, tal como un fluido corporal, que comprenden la etapa de poner en contacto la muestra con un anticuerpo de la invención. El anticuerpo de la invención puede emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, ensayos de inmunoprecipitación y ensayos de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).

45 Un fluido corporal como se usa de acuerdo con la presente invención incluye muestras biológicas de un sujeto, tales como extracto de tejido, orina, sangre, suero, deposiciones y flemas.

50 En una realización, el método comprende poner en contacto un soporte sólido con un exceso de un cierto tipo de fragmento de anticuerpo que forma específicamente un complejo con una diana, tal como al menos una de las toxinas a las que se dirige el anticuerpo de la invención, en condiciones que permitan que el anticuerpo se una a la superficie del soporte sólido. El soporte sólido resultante al que se une el anticuerpo después se pone en contacto con una muestra de fluido biológico de manera que la diana presente en el fluido biológico se una al anticuerpo y forme un complejo diana-anticuerpo. El complejo puede marcarse con un marcador detectable. Como alternativa, la diana o el anticuerpo pueden marcarse antes de la formación del complejo. Por ejemplo, un marcador detectable (marcador) puede conjugarse con el anticuerpo. El complejo después puede detectarse y determinarse cuantitativamente, detectando y determinando cuantitativamente de esta manera la concentración de la diana en la muestra de fluido biológico.

60 Para aplicaciones particulares, el anticuerpo de la invención se conjuga con un marcador o molécula indicadora, seleccionada del grupo que consiste en moléculas orgánicas, marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos, marcadores coloreados, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y mezclas de los mismos. Pueden usarse anticuerpos conjugados con marcadores o moléculas indicadoras, por ejemplo, en sistemas de ensayo o métodos de diagnóstico. Por ejemplo, para diagnosticar una infección por *S. aureus* a patologías asociadas con dicha infección.

65 El anticuerpo de la invención se puede conjugar con otras moléculas que permiten la simple detección de dicho conjugado en, por ejemplo, ensayos de unión (p. ej., ELISA) y estudios de unión.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un kit que comprende un anticuerpo, que puede incluir, además de uno o más anticuerpos, diversos agentes de diagnóstico o terapéuticos. Un kit también puede incluir instrucciones para su uso en un método de diagnóstico o terapéutico. Dichas instrucciones pueden, por ejemplo, proporcionarse en un dispositivo incluido en el kit, por ejemplo, herramientas o un dispositivo para preparar una muestra biológica con fines de diagnóstico, tal como para separar una célula y/o fracción que contiene proteína antes de determinar la toxina o toxinas respectivas para diagnosticar una enfermedad. Ventajosamente, dicho kit incluye un anticuerpo y un agente o reactivo de diagnóstico que puede usarse en uno o más de los diversos métodos de diagnóstico descritos en el presente documento. En otra realización preferida, el kit incluye un anticuerpo, por ejemplo, en forma liofilizada, en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden mezclarse antes del uso para formar una composición detectable para la administración en un futuro cercano.

El anticuerpo denominado #AB-24 (también denominado en el presente documento #9028), específicamente la cadena ligera y/o la cadena pesada del anticuerpo, se caracteriza además por el material biológico depositado en la DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1b / Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig (DE) con los números de registro indicados en el presente documento.

DSM 26747 es una célula hospedadora *E. coli* transformada con un plásmido que comprende la secuencia codificante de la cadena pesada de #AB-24 (AB-24-HC): *Escherichia coli* DH5alfa AB-24-HC = DSM 26747, fecha de deposición: 8 de enero, 2013; depositador: Arsanis Biosciences GmbH, Vienna, Austria.

DSM 26748 es una célula hospedadora *E. coli* transformada con un plásmido que comprende la secuencia codificante de la cadena ligera de #AB-24 (AB-24-LC): *Escherichia coli* DH5alfa AB-24-LC = DSM 26748; fecha de deposición: 8 de enero, 2013; depositador: Arsanis Biosciences GmbH, Vienna, Austria.

La materia objeto de las siguientes definiciones se considera una realización como se describe en el presente documento:

1. Un anticuerpo con neutralización cruzada que neutraliza la toxina alfa (H1a) y al menos una de las toxinas de dos componentes de *Staphylococcus aureus*, donde el anticuerpo comprende al menos un sitio de unión poliespecífico que se une a la toxina alfa (H1a) y que se une a al menos una de las toxinas de dos componentes de *Staphylococcus aureus*.
2. Anticuerpo de acuerdo con la definición 1, en el que dicha toxina de dos componentes se selecciona del grupo que consiste en pares afines y no afines de componentes R y L de hemolisinas gamma, toxinas PVL y toxinas de tipo PVL, preferentemente cualquiera de HlgAB, HlgCB, LukSF, LukED, LukGH, LukS-HlgB, LukSD, HlgA-LukD, HlgA-LukF, LukG-HlgA, LukEF, LukE-HlgB, HlgC-LukD o HlgC-LukF.
3. Anticuerpo de acuerdo con la definición 1 o 2, en el que dicho sitio de unión se une a al menos dos o al menos tres toxinas de dos componentes, preferentemente a al menos dos o tres de cualquiera de HlgAB, HlgCB, LukSF y LukED, preferentemente HlgAB, HlgCB, LukSF y LukED.
4. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 3, en el que dicho sitio de unión es un sitio de unión de CDR, preferentemente que comprende las secuencias de CDR de un sitio de unión de VH y/o VL.
5. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 4, que es un anticuerpo monoclonal de longitud completa o un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende al menos un dominio de anticuerpo que incorpora el sitio de unión, preferentemente un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos murinos, quiméricos, anticuerpos humanizados o humanos, anticuerpos de cadena pesada, Fab, Fd, scFv y anticuerpos de un solo dominio tales como VH, VHH o VL, preferentemente un anticuerpo IgG1 humano.
6. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 5, que tiene una afinidad para unirse a cada una de las toxinas con una Kd menor de  $10^{-8}$  M, preferentemente menor de  $10^{-9}$  M.
7. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 6, que presenta potencia de neutralización *in vitro* en un ensayo basado en células con un valor de CI50 en relación de mAb:toxina (mol/mol) menor de 50:1, preferentemente menor de 10:1, y más preferentemente menor de 1:1.
8. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 7, que neutraliza las toxinas diana en animales e inhibe la patogénesis de *S. aureus in vivo*, preferentemente cualquiera de neumonía, bacteremia o septicemia, peritonitis y osteomielitis.
9. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 8, donde el anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo denominado #AB-24.



10. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 9, donde el anticuerpo comprende el mismo sitio de unión que un anticuerpo denominado #AB-24.
- 5 11. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 10, donde el anticuerpo procede de un anticuerpo producido por una célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26747 y/o DSM 26748, o una variante funcionalmente activa del mismo.
- 10 12. Anticuerpo de acuerdo con la definición 11, que comprende  
(a) una cadena ligera de anticuerpo producida por una célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26748; y/o  
(b) una cadena pesada de anticuerpo producida por una célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26747;  
(c) o una variante funcionalmente activa de (a) y/o (b).
- 15 13. Un plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos  
- que codifica una cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-LC incluida en una célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26748; y/o  
20 - que codifica una cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-HC incluida en una célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26747.
- 25 14. Un casete de expresión que comprende una secuencia codificante para expresar una cadena ligera y/o cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 12, procediendo dicho casete de expresión o secuencia codificante del plásmido de acuerdo con la definición 13.
- 30 15. Método para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 12, en el que una célula hospedadora se transforma con el plásmido de la definición 13 o el casete de expresión de acuerdo con la definición 14.
- 35 16. Una célula hospedadora que comprende el plásmido de acuerdo con la definición 13 o el casete de expresión de acuerdo con la definición 14.
- 40 17. La célula hospedadora de acuerdo con la definición 16, que está depositada con el número de depósito DSM 26747 o DSM 26748.
- 45 18. Método para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 12, en el que una célula hospedadora de acuerdo con la definición 16 o 17 se cultiva o se mantiene en condiciones para producir dicho anticuerpo.
- 50 19. Un método para identificar un anticuerpo protector candidato, que comprende:  
(a) proporcionar una muestra que contiene un anticuerpo o célula productora de anticuerpos; y  
(b) evaluar la unión de un anticuerpo presente en o producido por la muestra con un epítipo reconocido por el anticuerpo denominado #AB-24, donde una reacción positiva entre el anticuerpo y el epítipo identifica al anticuerpo como un anticuerpo protector candidato.
- 55 20. Un método para identificar un anticuerpo protector candidato, que comprende:  
(a) proporcionar una muestra que contiene un anticuerpo o célula productora de anticuerpos; y  
(b) evaluar la unión de un anticuerpo presente en o producido por la muestra a la toxina alfa y a al menos una toxina de dos componentes de *Staphylococcus aureus*, donde una reacción positiva entre el anticuerpo y las toxinas identifica al anticuerpo como un anticuerpo protector candidato.
- 60 21. Un método para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 12, que comprende  
(a) proporcionar un anticuerpo protector candidato identificado de acuerdo con la definición 19 o 20; y  
(b) producir un anticuerpo monoclonal, o una forma humanizada o humana del anticuerpo protector candidato, o un derivado del mismo con la misma especificidad de unión de epítipo que el anticuerpo protector candidato.
- 65 22. Un método para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 12, que comprende  
(a) inmunizar a un animal no humano con un epítipo reconocido por el anticuerpo denominado #AB-24;  
(b) formar líneas celulares inmortalizadas a partir de los linfocitos B aislados;  
(c) explorar las líneas celulares obtenidas en b) para identificar una línea celular que produce un anticuerpo monoclonal que se una al epítipo; y

(d) producir el anticuerpo monoclonal, o una forma humanizada o humana del anticuerpo, o un derivado del mismo con la misma especificidad de unión a epítipo que el anticuerpo monoclonal.

23. Un método para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 12, que comprende

- (a) inmunizar a un animal no humano con la toxina alfa y al menos un toxina de dos componentes de *Staphylococcus aureus* y aislar los linfocitos B productores de anticuerpos;
- (b) formar líneas celulares inmortalizadas a partir de los linfocitos B aislados;
- (c) explorar las líneas celulares para identificar una línea celular productora de un anticuerpo monoclonal que se una a la toxina alfa y a al menos una toxina de dos componentes de *Staphylococcus aureus*; y
- (d) producir el anticuerpo monoclonal, o una forma humanizada o humana del anticuerpo, o un derivado del mismo con la misma especificidad de unión a epítipo que el anticuerpo monoclonal.

24. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 12, para su uso en el tratamiento de un sujeto con riesgo de padecer o que padece una infección por *S. aureus*, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo para limitar la infección en el sujeto, para mejorar un estado patológico debido a dicha infección o para inhibir la patogénesis de la neumonía por *S. aureus*.

25. Anticuerpo para su uso de acuerdo con la definición 25, para proteger contra infecciones por *S. aureus*.

26. Anticuerpo para su uso de acuerdo con la definición 24 o 25, donde el anticuerpo se administra en una formulación parenteral o para la administración en la mucosa.

27. Preparación farmacéutica de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 12, que comprende preferentemente una formulación parenteral o para la administración en la mucosa, que contiene opcionalmente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

28. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 12, para uso diagnóstico para detectar cualquier infección por *S. aureus*, incluyendo infecciones por SARM (*S. aureus* resistente a meticilina) que produce un alto nivel de toxinas, tales como neumonía necrotizante, y la producción de toxinas en furunculosis y carbunculosis.

29. Anticuerpo para su uso de acuerdo con la definición 28, en el que se determina una infección sistémica con *S. aureus* en un sujeto *ex vivo* poniendo en contacto una muestra de fluido corporal de dicho sujeto con el anticuerpo, determinándose la infección por una reacción inmunitaria específica del sujeto.

30. Preparación de diagnóstico de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 12, que contiene opcionalmente el anticuerpo con un marcador y/o un reactivo de diagnóstico adicional con un marcador.

31. Epítipo conformacional aislado reconocido por un anticuerpo denominado #AB-24.

32. Un inmunógeno que comprende:

- (a) un epítipo de acuerdo con la definición 31;
- (b) opcionalmente otros epítopos no asociados de forma nativa con dicho epítipo de (a); e
- (c) un vehículo.

33. Inmunógeno de acuerdo con la definición 32, donde dicho vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable, que comprende preferentemente sustancias tampón y/o coadyuvantes.

34. Inmunógeno de acuerdo con la definición 32 o 33, en una formulación de vacuna, preferentemente para uso parenteral.

35. Inmunógeno de acuerdo con cualquiera de las definiciones 32 a 34, para su uso en el tratamiento de un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz de dicho inmunógeno para proteger al sujeto de una infección por *S. aureus*, para prevenir un estado patológico debido a dicha infección o para inhibir la patogénesis de la neumonía por *S. aureus*.

36. Inmunógeno de acuerdo con la definición 35, para inducir una respuesta inmunitaria protectora.

37. Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones 1 a 12 o un epítipo de acuerdo con la definición 31.

La descripción anterior se entenderá más completamente con referencia a los ejemplos siguientes. Dichos ejemplos son, sin embargo, meramente representativos de los métodos de la práctica de una o más realizaciones de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

**EJEMPLOS**

Ejemplo 1: Generación de toxinas recombinantes

5 Diez toxinas de *S. aureus* - Hla, LukF, LukD, LukS, LukE, HlgA, HlgC, HlgB, LukG y LukH - se produjeron de manera recombinante en *E. coli* (BL21, Rosetta o Tuner DE3) (Fig. 1). Se optimizaron los codones de los genes de las toxinas para las proteínas maduras (determinado usando SignalP 4.1 Server; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para la expresión en *E. coli* y se generaron por síntesis de péptidos basándose en secuencias genómicas publicadas de las cepas de *Staphylococcus aureus* USA300\_TCH1516, MRSA252 y MSHR1314 (Sec ID 1 a 28, Fig. 9. Todas las toxinas, excepto LukG y LukH, se expresaron en forma soluble con un marcador NusA/His<sub>6</sub> N-terminal que se retiró proteolíticamente. La purificación consistió típicamente en tres etapas cromatográficas 1) IMAC (Columna de afinidad con metal inmovilizado) 2) intercambio catiónico o IMAC, y 3) cromatografía de exclusión molecular. LukG y LukH se expresaron sin marcadores en forma soluble, las proteínas se replegaron en cuerpos de inclusión y se purificaron; la purificación consistía en dos etapas en la columna de exclusión molecular en el caso de LukH y una etapa de intercambio catiónico y una de intercambio aniónico a pH 10,2 - 11,0 en el caso de LukG.

Las proteínas se ensayaron para determinar su pureza (por SDS-PAGE) y estado monomérico (por exclusión molecular) y su secuencia secundaria (determinada por dicroísmo circular) se comparó con los datos bibliográficos, cuando estaban disponibles. Todas las proteínas se marcaron con el reactivo que reacciona con el grupo amino Sulfo-NHS-LC biotina.

Ejemplo 2: Selección de anticuerpos monoclonales humanos que se unen a toxinas

25 Se seleccionaron anticuerpos que se unían a toxinas mediante bibliotecas de presentación en superficie desarrolladas de acuerdo con los documentos W02009/036379A2, W02012009568 y W02010105256. Las moléculas de toxina se expresaron como proteínas producidas por *E. coli* recombinante y se marcaron con biotina. Todas las toxinas se ensayaron para determinar su alta pureza e integridad, y también para determinar su funcionalidad en ensayos *in vitro* e *in vivo* por exposición a las toxinas de ratones como se describe en el Ejemplo 3.

30 Se incubó una biblioteca de células de levadura modificadas por ingeniería genética para expresar anticuerpos IgG1 humanos de longitud completa con una diversidad de aproximadamente 10<sup>9-10</sup> con toxinas marcadas con biotina a diferentes concentraciones. Se aislaron células de levadura que expresaban anticuerpos con la capacidad de unión a las toxinas por selección con perlas magnéticas y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) empleando reactivos secundarios de estreptavidina en varias vueltas de selección sucesivas (hasta cinco). Después se produjeron anticuerpos por los clones de levadura seleccionados y se purificaron por cromatografía de afinidad de Proteína A. La unión de mAb solubles individuales a las diferentes toxinas se confirmó por mediciones de interferometría usando un instrumento ForteBio Octet Red [Pall Life Sciences]; el antígeno biotinilado o el anticuerpo se inmovilizó en el sensor y se midió la asociación y disociación del fragmento de anticuerpo Fab o del antígeno, respectivamente (típicamente 200 nM), en solución. Las afinidades (valores de K<sub>d</sub>) se calcularon basándose en los parámetros cinéticos medidos (kon y koff)

Ejemplo 3: Identificación de mAb humanos capaces de neutralizar múltiples exotoxinas de estafilococos.

45 En primer lugar, se ensayaron 12 MaB de unión a Hla con secuencias de CDR especiales con respecto a la neutralización de Hla en dos ensayo *in vitro* diferentes usando glóbulos rojos de conejo o la línea de células epiteliales de pulmón humanas A549. Para el ensayo de inhibición de la toxina con células epiteliales de pulmón humanas (A549, HPACC #86012804), las células se tripsinizaron y se cultivaron el día anterior a una densidad de 20.000 células por pocillo (placas de luminiscencia de 96 pocillos "half area", Greiner, Austria) en medio F12K (Gibco, Estados Unidos) suplementado con FCS al 10% y Pen/Estrep. Los anticuerpos se diluyeron en serie en medio F12K suplementado con FCS al 5% y Pen/Estrep (= medio de ensayo de células A549) en una placa de dilución separada y se mezclaron con hemolisina alfa (Hla) purificada del sobrenadante de cultivo bacteriano a una concentración fija [3,03 nM]. Después de una etapa de preincubación de 1 hora a temperatura ambiente, se desechó el medio de siembra en células A549 adherentes y se reemplazó por la mezcla de mAb-toxina. Las células se intoxicaron durante 6 horas a 37°C +5% de CO<sub>2</sub> y después se midió la viabilidad usando un kit disponible en el mercado (Ensayo de Viabilidad de Células Luminiscentes Cell Titer-Glo®; Promega, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El % de viabilidad se calculó con respecto a controles tratados de forma simulada. El % de inhibición de la actividad de la toxina se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [( \text{toxina de viabilidad solo} - \text{actividad inhibida} ) / ( \text{toxina de viabilidad solo} )] \times 100$$

60 Para la inhibición de la hemólisis de glóbulos rojos de conejo, se obtuvo EDTA-glóbulos rojos de conejo a partir de conejos blancos New Zealand (Preclinics GmbH, Alemania). La sangre se diluyó 1:1 con PBS sin Ca/Mg (PAA Laboratories, Austria) y se prepararon gradientes poniendo 15 ml de sangre diluida sobre 15 ml de LSM 1077 (PAA Laboratories, Austria) en tubos de polipropileno de 50 ml. Después de la centrifugación a 680 x g (TA, sin freno) se retiraron las plaquetas, el plasma, las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) y el Ficoll por aspiración y se desecharon. El sedimento de glóbulos rojos restante se lavó dos veces en 40 ml de PBS sin Ca/Mg (centrifugación

680 x g, TA, sin freno) y finalmente se resuspendió en 20 ml de PBS sin Ca/Mg. La integridad y el número de eritrocitos se determinaron en un hemocitómetro convencional. Para los ensayos de neutralización con anticuerpos monoclonales, los anticuerpos se diluyeron en serie en PBS y se mezclaron con hemolisina alfa a una concentración fija [12,12 nM]. El ensayo de hemólisis se inició después de una etapa de preincubación de 1 hora para permitir la unión al anticuerpo-toxina. Se añadieron  $5 \times 10^7$  glóbulos rojos de conejo diluidos en PBS sin Ca/Mg por pocillo. El % de inhibición de actividad de la toxina se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [(\text{hemólisis de toxina solo} - \text{actividad inhibida}) / (\text{hemólisis de toxina solo})] \times 100.$$

7 de los 12 mAb presentaron actividad neutralizadora en las concentraciones ensayadas, que variaban de muy potentes a débilmente neutralizadoras (Fig. 2). Estos 7 anticuerpos tenían afinidades que variaban de  $K_d = 9 - > 300$  nM (medido por ForteBio [Pall Life Sciences]) y una potencia de neutralización fuertemente correlacionada con la afinidad.

Las secuencias de CDR de estos 7 mAb se usaron para generar una primera serie de bibliotecas de maduración de afinidad que se ensayaron de nuevo con Hla (concentración menor que la usada para la selección de biblioteca virgen) para seleccionar anticuerpos de descendencia de mayor afinidad. La descendencia de mayor afinidad de cada linaje se sometió adicionalmente a maduración de afinidad por una segunda serie de maduración de afinidad. Los 42 mAb resultantes de los 7 linajes tenían aumentos de hasta 10.000 veces en afinidad y potencia de neutralización. Muchos mAb alcanzaron la medida del límite de afinidad incluso con un método MSD altamente sensible usando un instrumento Sector Imager 2400 (Meso Scale Discovery). Típicamente, se incubó una concentración 20 pM de antígeno biotinilado con Fab o IgG, a diversas concentraciones, durante 16 h a temperatura ambiente, y el antígeno no unido se capturó en IgG inmovilizada; un gráfico de antígeno no unido frente a la concentración de Fab o IgG proporciona la constante de disociación,  $K_d$ .] ( $K_d$  4 pM, Fig. 3) y la mayoría de ellos también alcanzaron el límite teórico de los ensayos de neutralización *in vitro* con valores de  $CI_{50}$  de 0,25 expresados como relación de mAb a toxina (1:4) (Fig. 4).

Ejemplo 4: Ensayo para determinar la potencia de neutralización cruzada de mAb seleccionados para la toxina Hla

El ensayo de los 42 mAb de Hla de los siete linajes con respecto a la reactividad cruzada con toxinas de dos componentes reveló una sola descendencia derivada del clon virgen con neutralización más débil que presentaba afinidades de unión en el intervalo picomolar a Hla, HlgB y LukF, y en el intervalo nM de un solo dígito en el caso de LukD. Fig. 5. La unión a estas toxinas relacionadas de forma distante dio como resultado una neutralización muy potente de las toxinas de dos componentes correspondientes HlgB-HlgC, HlgB-HlgA, LukSF (PVL) y LukED (Fig. 6).

El mismo mAb con amplia neutralización cruzada (#AB-24) se identificó a partir de las bibliotecas de levadura con exploración alterna con Hla y componentes R.

El potencial de neutralización del linaje #7667 contra Hla se determinó en células A549 (Fig. 6A) y en glóbulos rojos de conejo como se describe en el Ejemplo 3. Todos los mAb de este linaje podían inhibir la actividad de la hemolisina alfa. La potencia estaba bien correlacionada con el estado de maduración. Aunque la actividad de neutralización más débil se observó con el clon virgen #7667, la máxima protección se vio con los clones #9024, #AB-24, #9029 y #9030, que se generaron usando una segunda serie de bibliotecas de maduración de afinidad. El clon de mAb #8268, generado por maduración empleando la primera biblioteca de maduración de afinidad, presentó una actividad de neutralización intermedia.

La actividad de neutralización cruzada contra las toxinas de dos componentes LukE-LukD, HlgB-HlgC y LukS-LukF se evaluó en un ensayo de viabilidad con neutrófilos humanos (Fig. 6). Para este fin, se aislaron neutrófilos de sangre entera humana recién extraída, obtenida del Red Cross (heparinizada) u obtenida por punción venosa de voluntarios sanos normales en tubos vacutainer K-EDTA (BD, Estados Unidos). Para agregar los eritrocitos, se añadió 1 parte de solución HetaSep (Stem Cell Technologies, Francia) a 5 partes de sangre, se mezcló y se incubó a 37°C hasta que la interfase de plasma/eritrocitos fue aproximadamente un 50% del volumen total. La capa de plasma enriquecida en leucocitos se depositó cuidadosamente sobre un gradiente de Percoll de dos etapas (73% y 63% de Percoll Plus diluido en HBSS, GE Healthcare) y se centrifugó a 680 x g, TA, 30 min, sin freno. La primera y segunda capa del gradiente después de la centrifugación (principalmente suero y monocitos) se retiró por aspiración. Se recogieron neutrófilos de la segunda capa opaca y se lavaron dos veces en 50 ml de HBSS (Gibco, Estados Unidos) + Glucosa 10 mM. El número de células viables se contó usando exclusión de colorante azul tripán en un hemocitómetro. El método de aislamiento descrito normalmente produjo  $1-5 \times 10^8$  neutrófilos con una viabilidad > 95% de 50 ml de sangre entera. Para los ensayos de viabilidad, las células se resuspendieron en RPMI 1640 (PAA Laboratories, Austria) suplementado con FCS al 10%, L-Glutamina y Pen/Estrep (=medio de neutrófilos). Los anticuerpos monoclonales se diluyeron en serie en medio de neutrófilos y se mezclaron con toxinas a una concentración fija que redujo la viabilidad celular > 95% [2,94 nM para LukS-LukF y HlgC-HlgB, 7,35 nM para LukE-LukD]. El ensayo de viabilidad se inició después de una etapa de preincubación de 1 hora para permitir la unión de anticuerpo-toxina. se añadieron 25.000 células por pocillo y la reacción se incubó durante 4 horas a 37°C, + CO<sub>2</sub> al 5%. Después se examinó la viabilidad de PMN usando un kit disponible en el mercado (Ensayo de Viabilidad de Células Luminescentes Cell Titer-Glo®; Promega, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El % de viabilidad se calculó con respecto

a controles tratados de forma simulada. El % de inhibición de actividad de la toxina se calculó usando la siguiente fórmula: % de inhibición = [(viabilidad de toxina solo - actividad inhibida) / (viabilidad de toxina solo)] x 100. Se incluyeron los siguientes mAb de control: #8247 (mAb monoespecífico para Hla procedente de otro linaje (#7660)), #8207 (mAb monoespecífico para LukD en ensayo de LukE-LukD), #8210 (mAb monoespecífico para LukF en ensayo de LukS-LukF), #8182 (mAb monoespecífico para HlgB en ensayo de HlgC-HlgB) y #7335 (mAb de control negativo generado contra lisozima de huevo de gallina en todos los ensayos).

Aunque el mAb virgen #7667 y los mAb de la descendencia #8268, generados por maduración usando la primera biblioteca de maduración de afinidad, no mostraron actividad neutralizadora detectable contra ninguna de las toxinas de dos componentes afines, la descendencia correspondiente de mAb #AB-24, generada por maduración usando la segunda biblioteca de maduración de afinidad, resultó ser un potente inhibidor de LukE-LukD, HlgC-HlgB y LukS-LukF en neutrófilos humanos (Fig. 6). Aunque fueron comparables en la actividad neutralizadora de Hla, los otros mAb madurados del mismo linaje que se maduraron usando la segunda biblioteca de maduración de afinidad no pudieron neutralizar de forma cruzada las tres toxinas de dos componentes en este ensayo. Sin embargo, se observó que #9029 tenía una potencia comparable a #AB-24 en la neutralización de LukE-LukD. Los resultados de los ensayos de neutralización *in vitro* estuvieron de acuerdo con las mediciones de kD de ForteBio, donde #AB-24 mostró unión a Hla x HlgB x LukD x LukF, y se observó que #9029 se unía a Hla x LukD.

#### Ejemplo 5: Ensayo para determinar la actividad biológica

La potencia *in vitro* resultó ser predictiva de la eficacia *in vivo*. El tratamiento de ratones con los mAb #AB-24 les protegía muy bien frente a la exposición letal a toxinas Hla o HlgAB (Fig. 7). El potencial de neutralización cruzada *in vivo* del mAb #AB-24 se ensayó en diversos modelos de ratón. En estudios piloto, la concentración letal mínima de las toxinas purificadas de interés se determinó mediante la administración de diluciones seriadas y la posterior supervisión de la supervivencia durante 14 días. En el caso de la instilación nasal de Hla, se observó que la dosis letal mínima era 0,32 mg/ratón. Después de la inyección intravenosa de diversas dosis de HlgAB, se determinó una dosis letal mínima de 0,375 mg (de los dos componentes).

Basándose en estos resultados, en los experimentos de exposición que pretendían ensayar la capacidad protectora de la inmunización pasiva por mAb, se usaron las siguientes dosis de exposición: 0,4 mg para Hla aplicado por vía intranasal, y 0,5 mg para cada componente de HlgAB administrados por vía intravenosa.

La inmunización pasiva con mAb #AB-24 se realizó por vía intraperitoneal 4 h (exposición a Hla) o 24 h (exposición a HlgAB) antes de la exposición letal por toxinas. Grupos de 5 ratones recibieron diversas dosis de los mAb individuales disueltos en PBS. Los grupos de control recibieron PBS sola o la dosis mayor de mAb no específico de isotipo correspondiente. Después de la exposición a toxinas purificadas, se supervisó la letalidad de los ratones durante 7 días.

En la Fig. 7 se representa el resultado del experimento de exposición a Hla. Los ratones de control LI sucumbieron a la exposición a la toxina dentro de un periodo de 24 h, mientras que el mAb #AB-24 proporcionó una protección significativa repetidamente a la dosis de 100 mg de mAb/ratón (60-100%). El mismo anticuerpo también protegió a los ratones de la exposición letal a HlgAB y rescató el 80% y el 40% de los ratones a dosis de 200 y 50 mg/ratón, respectivamente.

Estos experimentos probaron el potencial de reacción cruzada de #AB-24 para las dos citotoxinas más importantes de estafilococos que están relacionadas estructuralmente, sin embargo, estas dos toxinas solo están relacionadas de forma muy distante a nivel de la secuencia de aminoácidos primaria (identidad de aminoácidos del 27%).

#### Ejemplo 6: Ensayo para determinar la competición de mAb Hla

La competición entre los mAb Hla se estudió por interferometría (Forte-Bio). En una situación típica, se inmovilizó Hla [5 mg/ml en tampón (PBS más BSA al 0,1 %)] en sensores de Estreptavidina (Pall Life Sciences). Los sensores después se trataron con el anticuerpo primario (o tampón solo), seguido del anticuerpo secundario (10 mg/ml de cada uno), típicamente durante 10 min cada uno; (la condición de tampón solo dio la respuesta correspondiente a una unión del 100% del anticuerpo secundario a Hla). Se calculó el porcentaje de inhibición de unión al anticuerpo secundario, para cada anticuerpo primario (Figura 8).

Para los tres anticuerpos mostrados en la Figura 8, la auto-inhibición varió del 81 al 91%, mientras que la inhibición entre diferentes anticuerpos varió del 30 al 76%. Para el fin de una diferenciación fina entre anticuerpos, y basándose en los datos con anticuerpos de Hla adicionales, en este estudio se estableció un límite de inhibición del 80%. Por lo tanto, se consideró que cualquier anticuerpo que es capaz de inhibir la unión del segundo anticuerpo en un 80% compite con dicho anticuerpo secundario, mientras que si la inhibición cae por debajo del 80%, los anticuerpos no son suficientemente competitivos.

ES 2 546 105 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Arsanis Biosciences GmbH

<120> ANTICUERPO DE REACCIÓN CRUZADA CONTRA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

5 <130> AR002P

<160> 28

<170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1

<211> 879

<212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus*

15

<400> 1

```

gccgacagcg acatcaàcat caàaacgggc acgacggaca ttggctcaaa tacgacggtg      60
aaaacgggcg atctgggttac ctatgacaaa gaaaacggca tgcataaaaa agtgttttat      120
agtttcatcg atgacaaaaa ccacaacaaa aaactgctgg tcattcgtac caaaggcagc      180
atcgcaggcc agtatcgcgt gtacagcgaa gaaggcgcta ataaatcagg tctggcatgg      240
ccgtcggcct ttaaagtcca gctgcaactg ccggataacg aagtcgcgca aattagcgac      300
tattaccgcg gtaactctat cgatacctaa gaatacatgt ctaccctgac gtacggcttc      360
aacggtaatg ttaccggcga tgacacgggt aaaattggcg gtctgatcgg cgccaacgtg      420
agcattggtc ataccctgaa atatgttcag ccggacttta aaaccatcct ggaatctccg      480
acggataaaa aagtgggctg gaaagttatc ttcaacaaca tggtaacca gaactggggt      540
ccgtatgatc gtgactcatg gaaccgggtc tacggcaatc aactgtttat gaaaaccgcg      600
aacggttcga tgaaagcggc cgataacttc ctggacccga ataaagcgag ctctctgctg      660
agttccggct ttagtccgga cttcgcgacc gtgattacga tggatcgcaa agcctccaaa      720
cagcaaacca atattgatgt catctatgaa cgtgtgcgcy atgactacca gctgcactgg      780
accagcacga actggaaagg taccaatagc aaagataaat ggattgaccg ctctcggaa      840
cgctacaaaa ttgactggga aaaagaagaa atgacgaac      879
    
```

20

<210> 2

<211> 293

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

25

<400> 2

```

Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly Ser
 1           5           10
Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu Asn
          20           25           30
Gly Met His Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn His
          35           40           45
    
```

ES 2 546 105 T3

Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly Gln  
 50 55 60  
 Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala Trp  
 65 70 75 80  
 Pro Ser Ala Phe Lys Val Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val Ala  
 85 90 95  
 Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Glu Tyr  
 100 105 110  
 Met Ser Thr Leu Thr Tyr Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr Gly Asp Asp  
 115 120 125  
 Thr Gly Lys Ile Gly Gly Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly His  
 130 135 140  
 Thr Leu Lys Tyr Val Gln Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser Pro  
 145 150 155 160  
 Thr Asp Lys Lys Val Gly Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val Asn  
 165 170 175  
 Gln Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro Val Tyr Gly  
 180 185 190  
 Asn Gln Leu Phe Met Lys Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala Asp  
 195 200 205  
 Asn Phe Leu Asp Pro Asn Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Phe  
 210 215 220  
 Ser Pro Asp Phe Ala Thr Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala Ser Lys  
 225 230 235 240  
 Gln Gln Thr Asn Ile Asp Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg Asp Asp Tyr  
 245 250 255  
 Gln Leu His Trp Thr Ser Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr Lys Asp  
 260 265 270  
 Lys Trp Ile Asp Arg Ser Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp Trp Glu Lys  
 275 280 285  
 Glu Glu Met Thr Asn  
 290

<210> 3  
 <211> 852  
 <212> ADN  
 <213> *Staphylococcus aureus*

ES 2 546 105 T3

<400> 3

```

gacaacaaca ttgaaaacat tggatgatggc gcagaagtgg tgaaacgcac ggaagatacc      60
tcaagcgata aatgggggtgt gacgcagaac attcagttcg atttcgtcaa agacaaaaaa      120
tacaacaag atgcactgat tctgaaaatg caaggettta tcaacagcaa aaccacgtac      180
tacaactaca aaaacaccga ccatatcaaa gctatgcgtt ggccgttcca gtacaatatc      240
ggtctgaaaa cgaacgatcc gaatggtgac ctgatcaact acctgccgaa aaacaaaatc      300
gattcagtga acgtttcgca aaccctgggc tacaatatcg gcggttaact taatagtggc      360
ccgtccaccg gcggtaacgg tagcttcaac tactctaaaa cgatcagtta caaccagcaa      420
aactacatct ctgaagtcca acgtcagaac agcaaactcg tgcaatgggg cattaaagcg      480
aattccttta tcacctcact gggcaaaaatg tcgggtcatg atccgaacct gtttgtgggt      540
tataaacctg acagccagaa cccgcgcgat tatttcgctc cggacaatga actgccgccg      600
ctggtccatt ctggctttaa cccgagtttc attgcaaccg tgagccacga aaaaggctcg      660
ggtgatacca gcgaatttga aatcacgtat ggtcgcaata tggacgttac ccatgcgacg      720
cgtcgcacca cgcactatgg caactcctac ctggaaggtt cacgtattca caatgccttc      780
gttaaccgca attacacggt gaaatacga gtaactgga aaacgcacga aatcaaagtg      840
aaaggtcata ac                                                    852
    
```

5

<210> 4  
 <211> 284  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus*

10

<400> 4

```

Asp Asn Asn Ile Glu Asn Ile Gly Asp Gly Ala Glu Val Val Lys Arg
 1              5              10              15

Thr Glu Asp Thr Ser Ser Asp Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Ile Gln
 20              25              30

Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Leu
 35              40              45

Lys Met Gln Gly Phe Ile Asn Ser Lys Thr Thr Tyr Tyr Asn Tyr Lys
 50              55              60

Asn Thr Asp His Ile Lys Ala Met Arg Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile
 65              70              75              80

Gly Leu Lys Thr Asn Asp Pro Asn Val Asp Leu Ile Asn Tyr Leu Pro
 85              90              95

Lys Asn Lys Ile Asp Ser Val Asn Val Ser Gln Thr Leu Gly Tyr Asn
 100             105             110
    
```



ES 2 546 105 T3

Ile Gly Gly Asn Phe Asn Ser Gly Pro Ser Thr Gly Gly Asn Gly Ser  
 115 120 125

Phe Asn Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Ile Ser  
 130 135 140

Glu Val Glu Arg Gln Asn Ser Lys Ser Val Gln Trp Gly Ile Lys Ala  
 145 150 155 160

Asn Ser Phe Ile Thr Ser Leu Gly Lys Met Ser Gly His Asp Pro Asn  
 165 170 175

Leu Phe Val Gly Tyr Lys Pro Tyr Ser Gln Asn Pro Arg Asp Tyr Phe  
 180 185 190

Val Pro Asp Asn Glu Leu Pro Pro Leu Val His Ser Gly Phe Asn Pro  
 195 200 205

Ser Phe Ile Ala Thr Val Ser His Glu Lys Gly Ser Gly Asp Thr Ser  
 210 215 220

Glu Phe Glu Ile Thr Tyr Gly Arg Asn Met Asp Val Thr His Ala Thr  
 225 230 235 240

Arg Arg Thr Thr His Tyr Gly Asn Ser Tyr Leu Glu Gly Ser Arg Ile  
 245 250 255

His Asn Ala Phe Val Asn Arg Asn Tyr Thr Val Lys Tyr Glu Val Asn  
 260 265 270

Trp Lys Thr His Glu Ile Lys Val Lys Gly His Asn  
 275 280

<210> 5  
 <211> 903  
 <212> ADN  
 <213> *Staphylococcus aureus*  
 <400> 5

5

ES 2 546 105 T3

gcgcagcaca	tcacgccggt	ctccgaaaaa	aaagttgacg	acaaaatcac	cctgtataaa	60
acgacggcca	cgagcgactc	tgacaaactg	aaaatttctc	agatcctgac	cttcaacttc	120
atcaaagata	aaagttacga	taaagacacg	ctgattctga	aagcggcccg	taacatctat	180
tctggctaca	ccaaaccgaa	tccgaaagac	acgatcagct	ctcaattcta	ctggggttcc	240
aaatacaaca	tctcaatcaa	cagtgattcc	aacgactccg	tcaatgtggt	tgattatgca	300
ccgaaaaacc	agaatgaaga	attccaagtc	cagcaaaccg	tgggctatag	ttacggcggt	360
gacattaaca	tctcgaatgg	tctgagcggc	ggcggcaacg	gctcaaaatc	gttcagcgaa	420
acgatcaact	acaaacagga	atcttaccgt	accagctctg	ataaacgcac	gaatttcaag	480
aaaattgggt	gggacgttga	agcgcataaa	atcatgaaca	atgggtgggg	cccgtatggc	540
cgtgattctt	atcacagtac	ctacggtaac	gaaatgtttc	tgggctcccg	ccagtcaaac	600
ctgaatgccg	gtcaaaattt	cctggaatac	cataaaatgc	cggttctgag	ccgtggtaac	660
tttaatccgg	aattcattgg	cgctctgtcg	cgcaaacaga	acgcagcgaa	aaaatctaaa	720
atcaccgtga	cgtatcagcg	tgaaatggat	cgctacacca	acttttgtaa	tcaactgcat	780
tgatcggca	acaactacaa	agatgaaaac	cgtgccaccc	acacgagcat	ctacgaagtt	840
gactgggaaa	accacacggt	gaaactgatt	gatacccaaa	gtaaagaaaa	aaacccgatg	900
tcg						903

<210> 6  
 <211> 301  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus*  
 <400> 6

5

ES 2 546 105 T3

Ala Gln His Ile Thr Pro Val Ser Glu Lys Lys Val Asp Asp Lys Ile  
 1 5 10 15

Thr Leu Tyr Lys Thr Thr Ala Thr Ser Asp Ser Asp Lys Leu Lys Ile  
 20 25 30

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

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

Lys Pro Asn Pro Lys Asp Thr Ile Ser Ser Gln Phe Tyr Trp Gly Ser  
 65 70 75 80

Lys Tyr Asn Ile Ser Ile Asn Ser Asp Ser Asn Asp Ser Val Asn Val  
 85 90 95

Val Asp Tyr Ala Pro Lys Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln Gln  
 100 105 110

Thr Val Gly Tyr Ser Tyr Gly Gly Asp Ile Asn Ile Ser Asn Gly Leu  
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Asn Gly Ser Lys Ser Phe Ser Glu Thr Ile Asn Tyr  
 130 135 140

Lys Gln Glu Ser Tyr Arg Thr Ser Leu Asp Lys Arg Thr Asn Phe Lys  
 145 150 155 160

Lys Ile Gly Trp Asp Val Glu Ala His Lys Ile Met Asn Asn Gly Trp  
 165 170 175

Gly Pro Tyr Gly Arg Asp Ser Tyr His Ser Thr Tyr Gly Asn Glu Met  
 180 185 190

ES 2 546 105 T3

Phe Leu Gly Ser Arg Gln Ser Asn Leu Asn Ala Gly Gln Asn Phe Leu  
 195 200 205  
 Glu Tyr His Lys Met Pro Val Leu Ser Arg Gly Asn Phe Asn Pro Glu  
 210 215 220  
 Phe Ile Gly Val Leu Ser Arg Lys Gln Asn Ala Ala Lys Lys Ser Lys  
 225 230 235 240  
 Ile Thr Val Thr Tyr Gln Arg Glu Met Asp Arg Tyr Thr Asn Phe Trp  
 245 250 255  
 Asn Gln Leu His Trp Ile Gly Asn Asn Tyr Lys Asp Glu Asn Arg Ala  
 260 265 270  
 Thr His Thr Ser Ile Tyr Glu Val Asp Trp Glu Asn His Thr Val Lys  
 275 280 285  
 Leu Ile Asp Thr Gln Ser Lys Glu Lys Asn Pro Met Ser  
 290 295 300

<210> 7  
 <211> 849  
 <212> ADN  
 <213> *Staphylococcus aureus*

5

<400> 7  
 aatacgaata tcgaaaatat cggcgacggc gcagaagtta tcaaacgcac ggaagatgtc 60  
 agcagcaaaa aatggggtgt tacgcagaat gttcagttcg atttcgtcaa agacaaaaaa 120  
 tacaacaaag atgcactgat tgtgaaaatg caaggcttta tcaattctcg taccagtttc 180  
 tccgacgtta aaggcagtgg ttatgaactg acgaaacgca tgatttggcc gtttcagtac 240  
 aacatcggtc tgaccacgaa agatccgaac gtttccctga tcaactacct gccgaaaaac 300  
 aaaatcgaaa ccacggacgt cggccagacc ctgggttaca acattggcgg taattttcaa 360  
 agcgtccgt ctatcggcgg taacggctca ttcaattact cgaaaaccat tagctatacg 420  
 cagaaaagtt acgtgtccga agttgataaa caaaactcaa aatcgggtcaa atggggcgtg 480  
 aaagcgaacg aatttgtcac cccgatgggt aaaaaatctg cccatgaccg ttacctgttt 540  
 gtgcagtcgc cgaatgggcc gacgggtagc gcacgtgaat actttgcccc ggataatcag 600  
 ctgccgccgc tggtgcaatc tggctttaac ccgagtttca ttaccacgct gagccatgaa 660  
 aaaggcagct ctgatacctc cgaattcgaa atttcatatg gtcgtaatct ggacatcacc 720  
 tacgcaacgc tgtttccgcg taccggatc tatgcagaac gcaaacacaa cgcttttggt 780  
 aaccgcaatt tcgttgtccg ctacgaagtg aactggaaaa cccatgaaat caaagtgaaa 840  
 ggccataac 849

10

<210> 8  
 <211> 283  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus*

15

ES 2 546 105 T3

<400> 8

Asn Thr Asn Ile Glu Asn Ile Gly Asp Gly Ala Glu Val Ile Lys Arg  
 1 5 10 15  
 Thr Glu Asp Val Ser Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Val Gln  
 20 25 30  
 Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val  
 35 40 45  
 Lys Met Gln Gly Phe Ile Asn Ser Arg Thr Ser Phe Ser Asp Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Tyr Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr  
 65 70 75 80  
 Asn Ile Gly Leu Thr Thr Lys Asp Pro Asn Val Ser Leu Ile Asn Tyr  
 85 90 95  
 Leu Pro Lys Asn Lys Ile Glu Thr Thr Asp Val Gly Gln Thr Leu Gly  
 100 105  
 Tyr Asn Ile Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn  
 115 120 125  
 Gly Ser Phe Asn Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Thr Gln Lys Ser Tyr  
 130 135 140  
 Val Ser Glu Val Asp Lys Gln Asn Ser Lys Ser Val Lys Trp Gly Val  
 145 150 155 160  
 Lys Ala Asn Glu Phe Val Thr Pro Asp Gly Lys Lys Ser Ala His Asp  
 165 170 175  
 Arg Tyr Leu Phe Val Gln Ser Pro Asn Gly Pro Thr Gly Ser Ala Arg  
 180 185 190  
 Glu Tyr Phe Ala Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly  
 195 200 205  
 Phe Asn Pro Ser Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Lys Gly Ser Ser  
 210 215 220  
 Asp Thr Ser Glu Phe Glu Ile Ser Tyr Gly Arg Asn Leu Asp Ile Thr  
 225 230 235 240  
 Tyr Ala Thr Leu Phe Pro Arg Thr Gly Ile Tyr Ala Glu Arg Lys His  
 245 250 255

ES 2 546 105 T3

Asn Ala Phe Val Asn Arg Asn Phe Val Val Arg Tyr Glu Val Asn Trp  
 260 265 270

Lys Thr His Glu Ile Lys Val Lys Gly His Asn  
 275 280

<210> 9  
 <211> 903  
 <212> ADN  
 <213> *Staphylococcus aureus*

5

<400> 9  
 gcccaacaca ttacgccggt ctcggaaaaa aaagtggatg acaaaatcac gctgtataaa 60  
 acgacggcaa cctcagataa cgacaaactg aacattagtc agatcctgac cttcaacttc 120  
 atcaaagata aatcctacga taaagacacg ctgggtgctga aagcggccgg caacattaat 180  
 tcaggttaca aaaaaccgaa cccgaaagac tataattact cgcagtttta ttggggcggg 240  
 aaatacaacg tcagcgtgag ctctgaatct aacgatgcag tcaatgtggt tgactatgct 300  
 ccgaaaaacc agaatgaaga atttcaagtg cagcaaacc tgggctatag ctacggcggg 360  
 gatattaaca tctcaaatgg cctgtcgggc ggtctgaacg gttcgaaaag cttctctgaa 420  
 accatcaact acaaacagga aagctaccgt accacgattg atcgcaaac gaaccataaa 480  
 tctatcggct ggggtgttga agcgcacaaa attatgaaca atggctgggg tccgatggc 540  
 cgtgattcct atgacccgac ctacggtaat gaactgtttc tgggcgggctg ccagagtcc 600  
 tcaaaccgcg gccaaaattt cctgccgacg catcagatgc cgctgctggc acgtggtaac 660  
 tttaatccgg aattcatcag tgtgctgtcc cacaaacaaa acgataccaa aaaatctaaa 720  
 atcaaagtta cgtatcaacg tgaaatggac cgctacacca accagtggaa tcgcctgcat 780  
 tggggttgta acaactacaa aaaccagaac accgttacgt tcacctctac gtacgaagtc 840  
 gattggcaaa accatacggg caaactgatt ggcacggaca gcaaagaaac gaaccggggc 900  
 gtc 903

10

<210> 10  
 <211> 301  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus*

15

<400> 10  
 Ala Gln His Ile Thr Pro Val Ser Glu Lys Lys Val Asp Asp Lys Ile  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Tyr Lys Thr Thr Ala Thr Ser Asp Asn Asp Lys Leu Asn Ile  
 20 25 30  
 ser Gln Ile Leu Thr Phe Asn Phe Ile Lys Asp Lys Ser Tyr Asp Lys  
 35 40 45

ES 2 546 105 T3

Asp Thr Leu Val Leu Lys Ala Ala Gly Asn Ile Asn Ser Gly Tyr Lys  
 50 55 60  
 Lys Pro Asn Pro Lys Asp Tyr Asn Tyr Ser Gln Phe Tyr Trp Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Lys Tyr Asn Val Ser Val Ser Ser Glu Ser Asn Asp Ala Val Asn Val  
 85 90 95  
 Val Asp Tyr Ala Pro Lys Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln Gln  
 100 105 110  
 Thr Leu Gly Tyr Ser Tyr Gly Gly Asp Ile Asn Ile Ser Asn Gly Leu  
 115 120 125  
 Ser Gly Gly Leu Asn Gly Ser Lys Ser Phe Ser Glu Thr Ile Asn Tyr  
 130 135 140  
 Lys Gln Glu Ser Tyr Arg Thr Thr Ile Asp Arg Lys Thr Asn His Lys  
 145 150 155 160  
 Ser Ile Gly Trp Gly Val Glu Ala His Lys Ile Met Asn Asn Gly Trp  
 165 170 175  
 Gly Pro Tyr Gly Arg Asp Ser Tyr Asp Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu  
 180 185 190  
 Phe Leu Gly Gly Arg Gln Ser Ser Ser Asn Ala Gly Gln Asn Phe Leu  
 195 200 205  
 Pro Thr His Gln Met Pro Leu Leu Ala Arg Gly Asn Phe Asn Pro Glu  
 210 215 220  
 Phe Ile Ser Val Leu Ser His Lys Gln Asn Asp Thr Lys Lys Ser Lys  
 225 230 235 240  
 Ile Lys Val Thr Tyr Gln Arg Glu Met Asp Arg Tyr Thr Asn Gln Trp  
 245 250 255  
 Asn Arg Leu His Trp Val Gly Asn Asn Tyr Lys Asn Gln Asn Thr Val  
 260 265 270  
 Thr Phe Thr Ser Thr Tyr Glu Val Asp Trp Gln Asn His Thr Val Lys  
 275 280 285  
 Leu Ile Gly Thr Asp Ser Lys Glu Thr Asn Pro Gly Val  
 290 295 300

<210> 11  
 <211> 840  
 <212> ADN  
 <213> *Staphylococcus aureus*

ES 2 546 105 T3

<400> 11

gaaaacaaaa tcgaagacat cggccaaggt gctgaaatca tcaaacgcac gcaagacatc	60
acgagtaaac gcctggcaat cacgcagaat attcagttcg atttcgtgaa agacaaaaaa	120
tacaacaaag atgcactggg gggttaaaatg caaggcttta tcagctctcg taccacgtac	180
agcgatctga aaaaatatcc gtacattaaa cgcgatgatct ggccggtcca gtacaacatc	240
agtctgaaaa ccaaagattc caacgtggac ctgattaatt acctgccgaa aaacaaaatc	300
gatagtgcgg acgtttccca gaaactgggc tataacattg gcggtaattt tcaatcagcc	360
ccgtcgatcg gcggtagtgg ttccttcaat tactcaaaaa ccatctcgta caaccagaaa	420
aattacgtta cggaagtcga aagccaaaac tctaaaggcg tgaaatgggg tggtaaagcg	480
aattcatttg tcaccccgaa cggccagggtg tcggcgatg atcagtacct gtttgacaaa	540
gacccgacgg gtccggcagc acgtgattat ttcgttccgg acaatcagct gccgccgctg	600
attcaaagcg gctttaacct gtctttcatc accacgctgt cccatgaacg tggcaaaggt	660
gataaaagcg aatttgaaat tacctatggt cgcaacatgg atgcaaccta tgcttacggt	720
acgcgtcatc gcctggcagt cgatcgtaaa cacgacgctt tcaaaaaccg caatgtcacc	780
gtgaaatcag aagtcaactg gaaaacgcac gaagtcaaaa tcaaatcaat caccccgaaa	840

5

<210> 12

<211> 280

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

10

<400> 12



ES 2 546 105 T3

Glu Asn Lys Ile Glu Asp Ile Gly Gln Gly Ala Glu Ile Ile Lys Arg  
 1 5 10 15  
 Thr Gln Asp Ile Thr Ser Lys Arg Leu Ala Ile Thr Gln Asn Ile Gln  
 20 25 30  
 Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Val Val  
 35 40 45  
 Lys Met Gln Gly Phe Ile Ser Ser Arg Thr Thr Tyr Ser Asp Leu Lys  
 50 55 60  
 Lys Tyr Pro Tyr Ile Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Lys Thr Lys Asp Ser Asn Val Asp Leu Ile Asn Tyr Leu Pro  
 85 90 95  
 Lys Asn Lys Ile Asp Ser Ala Asp Val Ser Gln Lys Leu Gly Tyr Asn  
 100 105 110  
 Ile Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Ser Gly Ser  
 115 120 125

ES 2 546 105 T3

Phe Asn Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Asn Tyr Val Thr  
 130 135 140

Glu Val Glu Ser Gln Asn Ser Lys Gly Val Lys Trp Gly Val Lys Ala  
 145 150 155 160

Asn Ser Phe Val Thr Pro Asn Gly Gln Val Ser Ala Tyr Asp Gln Tyr  
 165 170 175

Leu Phe Ala Gln Asp Pro Thr Gly Pro Ala Ala Arg Asp Tyr Phe Val  
 180 185 190

Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Ile Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser  
 195 200 205

Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Arg Gly Lys Gly Asp Lys Ser Glu  
 210 215 220

Phe Glu Ile Thr Tyr Gly Arg Asn Met Asp Ala Thr Tyr Ala Tyr Val  
 225 230 235 240

Thr Arg His Arg Leu Ala Val Asp Arg Lys His Asp Ala Phe Lys Asn  
 245 250 255

Arg Asn Val Thr Val Lys Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu Val  
 260 265 270

Lys Ile Lys Ser Ile Thr Pro Lys  
 275 280

<210> 13  
 <211> 858  
 <212> ADN  
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 13

gcaaacgaca cggaagacat cggcaaaggt tcagacatcg aaatcatcaa acgcacggaa 60  
 gacaaaacga gcaataaatg ggggtgtgacc cagaacattc aattcgattt cgtgaaagac 120  
 aaaaaataca ataaagatgc gctgattctg aaaatgcagg gctttatcag ctctcgtacc 180  
 acgtactaca actacaagaa aaccaaccat gttaaagcca tgcgctggcc gttccaatac 240  
 aacatcggtc tgaaaacgaa tgacaaatat gtcagtctga ttaactacct gccgaaaaat 300  
 aaaategaat cgaccaacgt gagccagacg ctgggctata acattggcgg taattttcaa 360  
 tccgcaccgt cactgggagg taacggttca ttcaattact caaaatcgat cagctatacc 420  
 cagcaaaact acgtgtctga agttgaacag caaaattcta aaagtgtcct gtggggcgtg 480  
 aaagcgaata gctttgccac ggaatctggc cagaaaagtg catttgattc cgacctgttc 540  
 gtgggctata aaccgcattc aaaagatccg cgtgactact tcgtgccgga ttcggaactg 600

5

10

ES 2 546 105 T3

ccgccgctgg ttcagtcagg ttttaacccg tcgttcattg ctaccgttag tcacgaaaa 660  
ggcagttccg atacctccga attgaaatt acgtatggc gtaatatgga cgtcacccat 720  
gcaatcaaac gcagcacgca ctatggcaac tttacctgg atggcatcg tgttcacaat 780  
gcttttgta accgcaatta tacggtgaaa tacgaagtca actggaaaac gcacgaaatc 840  
aaagtcaaag gtcaaaac 858

5

<210> 14  
<211> 286  
<212> PRT  
<213> *Staphylococcus aureus*  
  
<400> 14

ES 2 546 105 T3

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

Lys Arg Thr Glu Asp Lys Thr Ser Asn Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn  
20 25 30

Ile Gln Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu  
35 40 45

Ile Leu Lys Met Gln Gly Phe Ile Ser Ser Arg Thr Thr Tyr Tyr Asn  
50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Asn His Val Lys Ala Met Arg Trp Pro Phe Gln Tyr  
65 70 75 80

Asn Ile Gly Leu Lys Thr Asn Asp Lys Tyr Val Ser Leu Ile Asn Tyr  
85 90 95

Leu Pro Lys Asn Lys Ile Glu Ser Thr Asn Val Ser Gln Thr Leu Gly  
100 105 110

Tyr Asn Ile Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Leu Gly Gly Asn  
115 120 125

Gly Ser Phe Asn Tyr Ser Lys Ser Ile Ser Tyr Thr Gln Gln Asn Tyr  
130 135 140

Val Ser Glu Val Glu Gln Gln Asn Ser Lys Ser Val Leu Trp Gly Val  
145 150 155 160

Lys Ala Asn Ser Phe Ala Thr Glu Ser Gly Gln Lys Ser Ala Phe Asp  
165 170 175

Ser Asp Leu Phe Val Gly Tyr Lys Pro His Ser Lys Asp Pro Arg Asp  
180 185 190

Tyr Phe Val Pro Asp Ser Glu Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe  
195 200 205

ES 2 546 105 T3

Asn Pro Ser Phe Ile Ala Thr Val Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp  
 210 215 220  
 Thr Ser Glu Phe Glu Ile Thr Tyr Gly Arg Asn Met Asp Val Thr His  
 225 230 235 240  
 Ala Ile Lys Arg Ser Thr His Tyr Gly Asn Ser Tyr Leu Asp Gly His  
 245 250 255  
 Arg Val His Asn Ala Phe Val Asn Arg Asn Tyr Thr Val Lys Tyr Glu  
 260 265 270  
 Val Asn Trp Lys Thr His Glu Ile Lys Val Lys Gly Gln Asn  
 275 280 285

<210> 15  
 <211> 900  
 <212> ADN  
 <213> *Staphylococcus aureus*

5

<400> 15

gcggaaggca aaattacccc ggtctcggtg aaaaaagttg acgacaaagt gacgctgtat 60  
 aaaacgacgg ccacggctga ttcggataaa tttaaaatta gccagatcct gaccttcaac 120  
 ttcatacaag ataaatctta cgataaagac accctgggtgc tgaaagcaac gggcaacatc 180  
 aatagcgggt ttgttaaacc gaacccgaat gattacgact tctcaaaact gtattggggc 240  
 gcaaaataca atgtttcgat tagctctcag agtaacgatt ccgtcaatgt ggttgactat 300  
 gctccgaaaa accaaaatga agaatttcag gtgcaaaaaca ccctggggtta cacgttcggc 360  
 ggtgatattt caatctcgaa tggcctgagt ggcggtctga acggttaatac cgcgttttcc 420  
 gaaacgatta actataaaca ggaaagctac cgtaccacgc tgtctcgcaa caccaattat 480  
 aaaaatgtcg gctgggggtgt ggaagcccat aaaatcatga acaatggctg ggggtccgtat 540  
 ggccgtgact cctttcacc gacgtacggc aacgaactgt tcctggcagg tcgccagagt 600  
 tccgcatatg cagggtcaaaa ttttattgcc cagcatcaaa tgccgctgct gagccgttct 660  
 aactttaatc cggaattcct gtcagtcctg tcgcaccgcc aggatggcgc gaaaaaatct 720  
 aaaatcaccg ttacgtacca gcgtgaaatg gacctgtacc aaatccgctg gaacggcttc 780  
 tattgggcag gtgctaacta caaaaacttc aaaacccgta cgttcaaate tacctatgaa 840  
 atcgattggg aaaaccacaa agtcaaactg ctggacacga aagaacgga aaataataaa 900

10

<210> 16  
 <211> 300  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus*

15

<400> 16

Ala Glu Gly Lys Ile Thr Pro Val Ser Val Lys Lys Val Asp Asp Lys  
 1 5 10 15

ES 2 546 105 T3

Val Thr Leu Tyr 20 Lys Thr Thr Ala 25 Thr Ala Asp Ser Asp Lys 30 Phe Lys  
 Ile Ser Gln 35 Ile Leu Thr Phe Asn 40 Phe Ile Lys Asp Lys 45 Ser Tyr Asp  
 Lys Asp 50 Thr Leu Val Leu Lys 55 Ala Thr Gly Asn Ile 60 Asn Ser Gly Phe  
 Val 65 Lys Pro Asn Pro Asn 70 Asp Tyr Asp Phe Ser 75 Lys Leu Tyr Trp Gly  
 Ala Lys Tyr Asn Val 85 Ser Ile Ser Ser Gln 90 Ser Asn Asp Ser Val 95 Asn  
 Val Val Asp Tyr 100 Ala Pro Lys Asn Gln 105 Asn Glu Glu Phe Gln 110 Val Gln  
 Asn Thr Leu 115 Gly Tyr Thr Phe Gly 120 Gly Asp Ile Ser Ile 125 Ser Asn Gly  
 Leu Ser 130 Gly Gly Leu Asn Gly 135 Asn Thr Ala Phe Ser 140 Glu Thr Ile Asn  
 Tyr 145 Lys Gln Glu Ser Tyr 150 Arg Thr Thr Leu Ser 155 Arg Asn Thr Asn Tyr 160  
 Lys Asn Val Gly Trp 165 Gly Val Glu Ala His 170 Lys Ile Met Asn Asn 175 Gly  
 Trp Gly Pro Tyr 180 Gly Arg Asp Ser Phe 185 His Pro Thr Tyr Gly 190 Asn Glu  
 Leu Phe Leu 195 Ala Gly Arg Gln Ser 200 Ser Ala Tyr Ala Gly 205 Gln Asn Phe  
 Ile Ala Gln His Gln Met Pro 215 Leu Leu Ser Arg Ser 220 Asn Phe Asn Pro  
 Glu 225 Phe Leu Ser Val Leu 230 Ser His Arg Gln Asp 235 Gly Ala Lys Lys Ser 240  
 Lys Ile Thr Val Thr 245 Tyr Gln Arg Glu Met 250 Asp Leu Tyr Gln Ile 255 Arg  
 Trp Asn Gly Phe 260 Tyr Trp Ala Gly Ala 265 Asn Tyr Lys Asn Phe 270 Lys Thr  
 Arg Thr Phe 275 Lys Ser Thr Tyr Glu 280 Ile Asp Trp Glu Asn 285 His Lys Val

ES 2 546 105 T3

Lys Leu Leu Asp Thr Lys Glu Thr Glu Asn Asn Lys  
 290 295 300

5 <210> 17  
 <211> 971  
 <212> ADN  
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 17

aactcggctc ataaagatag tcaggatcaa aataaaaaag aacacgtgga taaatcacia 60  
 cagaaagata aacgcaatgt caccaataaa gataaaaaata gcaccgcacc ggatgacatt 120  
 ggcaaaaacg gtaaaatcac caaacgtacc gaaacgggtg atgatgaaaa aacgaatatt 180  
 ctgcagaacc tgcaatttga tttcatcgat gacccgacct acgacaaaaa tgtgctgctg 240  
 gttaaaaaac agggcagcat tcattctaac ctgaaattcg aaagtcacaa agaagagaaa 300  
 aactccaact ggctgaaata tccgtcagaa taccatgtcg atttccaggt gaaacgtaat 360  
 cgcaaaaccg aaattctgga ccaactgccg aaaaacaaaa tcagtaccgc caaagttgat 420  
 agtacgtttt cctatagctc tggcggtaaa ttcgactcta ccaaaggcat cggctcgtag 480  
 agttccaact cactactcga aaccatctcg tacaaccagc aaaactacga tacgatcgca 540  
 agcggcaaaa acaataactg gcatgttcac tggctgtgca ttgctaacga tctgaaatat 600  
 ggcggtgaag ttaaaaatcg caacgacgaa ctgctgtttt accgtaatac ccgcatcgcg 660  
 acggtcgaaa acccggaact gtcattcgcg tcgaaatadc gttaccggcg cctgggtgctg 720  
 tccggtttta atccggaatt cctgacctac ctgagcaacg aaaaatctaa cgaaaaaacg 780  
 cagttcgaag tcacctatac gcgtaatcaa gatattctga aaaaccgtcc gggcattcac 840  
 tacgcaccgc cgatcctgga gaaaaacaaa gatggtcagc gcctgatcgt gacctatgaa 900  
 gttgactgga aaaacaaaac cgtgaaagtg gtggacaaat actcggacga caataaacgg 960  
 tacaagaag g 971

10  
 15 <210> 18  
 <211> 324  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 18

Asn Ser Ala His Lys Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val  
 1 5 10 15  
 Asp Lys Ser Gln Gln Lys Asp Lys Arg Asn Val Thr Asn Lys Asp Lys  
 20 25 30  
 Asn Ser Thr Ala Pro Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys  
 35 40 45  
 Arg Thr Glu Thr Val Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu  
 50 55 60

ES 2 546 105 T3

Gln Phe Asp Phe Ile Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu  
 65 70 75 80  
 Val Lys Lys Gln Gly Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His  
 85 90 95  
 Lys Glu Glu Lys Asn Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His  
 100 105 110  
 Val Asp Phe Gln Val Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln  
 115 120 125  
 Leu Pro Lys Asn Lys Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser  
 130 135 140  
 Tyr Ser Ser Gly Gly Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr  
 145 150 155 160  
 Ser Ser Asn Ser Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr  
 165 170 175  
 Asp Thr Ile Ala Ser Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser  
 180 185 190  
 Val Ile Ala Asn Asp Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn  
 195 200 205  
 Asp Glu Leu Leu Phe Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn  
 210 215 220  
 Pro Glu Leu Ser Phe Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg  
 225 230 235 240  
 Ser Gly Phe Asn Pro Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser  
 245 250 255  
 Asn Glu Lys Thr Gln Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile  
 260 265 270  
 Leu Lys Asn Arg Pro Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys  
 275 280 285  
 Asn Lys Asp Gly Gln Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys  
 290 295 300  
 Asn Lys Thr Val Lys Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Lys Pro  
 305 310 315 320  
 Tyr Lys Glu Gly



ES 2 546 105 T3

<211> 927  
 <212> ADN  
 <213> *Staphylococcus aureus*

5 <400> 19

```

aaaatcaaca gcgaaatcaa acaagtcagc gaaaaaaaaatc tggatggcga tacgaaaatg      60
tacacgcgca cggcaaccac gagcgattcg cagaaaaaca tcaccagag cctgcaattt      120
aatttcctga ccgaaccgaa ctacgataaa gaaacggtgt tcatcaaagc aaaaggcacc      180
atcggctcag gtctgcgtat tctggaccg aatggctact ggaactcgac cctgcgctgg      240
ccgggtagct attctgtgag tattcagaat gttgatgaca acaataacac caacgttacg      300
gattttgctc cgaaaaatca agatgaaagc cgtgaagtca aatataccta cggctataaa      360
acgggcggtg atttctctat caatcgcggc ggtctgaccg gtaatattac gaaagaatcg      420
aactatagcg aaaccatctc ctaccagcaa ccgtcatatc gtaccctgct ggatcagtc      480
acgtcacata aaggcgttgg ttggaaagtc gaagcgcacc tgatcaataa catgggccat      540
gatcacacc gtcaactgac gaatgatagc gacaaccgca cgaaatctga aatttttagt      600
ctgaccgcga atggtaacct gtgggcgaaa gataacttca cgccgaaaga caaatgccg      660
gtcaccgtgt ccgaaggcct taatccgaa ttctggccg ttatgtctca tgataaaaaa      720
gacaaaggta aaagtcagtt cgtggttcac tacaacggtt ccatggatga attcaaatc      780
gactggaacc gccatggctt ctggggttac tggagcggtg aaaaccacgt cgataaaaaa      840
gaagaaaaac tgtctgcact gtatgaagtg gactggaaaa cccacaatgt caaatcgtg      900
aaagttctga atgataatga aaaaaaa      927
    
```

10 <210> 20  
 <211> 309  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus*

15 <400> 20

```

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

ES 2 546 105 T3

Pro Gly Ser Tyr Ser<sub>85</sub> Val Ser Ile Gln Asn<sub>90</sub> Val Asp Asp Asn<sub>95</sub> Asn  
 Thr Asn Val Thr<sub>100</sub> Asp Phe Ala Pro Lys<sub>105</sub> Asn Gln Asp Glu Ser<sub>110</sub> Arg Glu  
 Val Lys Tyr<sub>115</sub> Thr Tyr Gly Tyr Lys<sub>120</sub> Thr Gly Gly Asp Phe<sub>125</sub> Ser Ile Asn  
 Arg Gly<sub>130</sub> Gly Leu Thr Gly Asn<sub>135</sub> Ile Thr Lys Glu Ser<sub>140</sub> Asn Tyr Ser Glu  
 Thr Ile Ser Tyr Gln<sub>145</sub> Gln<sub>150</sub> Pro Ser Tyr Arg Thr<sub>155</sub> Leu Leu Asp Gln Ser<sub>160</sub>  
 Thr Ser His Lys Gly<sub>165</sub> Val Gly Trp Lys Val<sub>170</sub> Glu Ala His Leu Ile Asn<sub>175</sub>  
 Asn Met Gly His<sub>180</sub> Asp His Thr Arg Gln<sub>185</sub> Leu Thr Asn Asp Ser<sub>190</sub> Asp Asn  
 Arg Thr Lys<sub>195</sub> Ser Glu Ile Phe Ser<sub>200</sub> Leu Thr Arg Asn Gly<sub>205</sub> Asn Leu Trp  
 Ala Lys<sub>210</sub> Asp Asn Phe Thr Pro<sub>215</sub> Lys Asp Lys Met Pro<sub>220</sub> Val Thr Val Ser  
 Glu Gly<sub>225</sub> Phe Asn Pro Glu<sub>230</sub> Phe Leu Ala Val Met<sub>235</sub> Ser His Asp Lys Lys<sub>240</sub>  
 Asp Lys Gly Lys Ser<sub>245</sub> Gln Phe Val Val His<sub>250</sub> Tyr Lys Arg Ser Met<sub>255</sub> Asp  
 Glu Phe Lys Ile<sub>260</sub> Asp Trp Asn Arg His<sub>265</sub> Gly Phe Trp Gly Tyr<sub>270</sub> Trp Ser  
 Gly Glu Asn His Val Asp Lys Lys<sub>280</sub> Glu Glu Lys Leu Ser<sub>285</sub> Ala Leu Tyr  
 Glu Val<sub>290</sub> Asp Trp Lys Thr His<sub>295</sub> Asn Val Lys Phe Val<sub>300</sub> Lys Val Leu Asn  
 Asp Asn Glu Lys Lys  
 305

<210> 21  
 <211> 966  
 <212> ADN  
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 21

ES 2 546 105 T3

gcaaacaagg actcccagga ccagaccaa aaagaacacg tcgataaagc acagcagaaa 60  
 gaaaagcgta atgtcaacga taaagataaa aataccccgg gcccggatga cattggcaaa 120  
 aacggcaagg ttaccaaacg taccgtcagt gaatatgaca aagaaccaa tattctgcag 180  
 aacctgcaat ttgatttcat cgatgaccgg acgtacgaca aaaatgtgct gctggttaa 240  
 aagcaaggta gtatccattc caacctgaag ttgaaagcc accgtaatga aaccaacgcg 300  
 agttggctga aatatccgtc cgaataccat gtcgatttcc aggtgcaacg caatccgaaa 360  
 acggaaattc tggaccagct gccgaaaaac aagatctcaa ccgcaaaagt ggattcgacg 420  
 tttagttatt ccctgggcgg taaattcgac agcaccaaag gcattggctg caccagcagc 480  
 aacagctact cgaagagcat ctcttacaac cagcaaaact acgataccat cgcaagcggc 540  
 aaaaacaata accgtcatgt tcaactggtc gtggttgcta atgatctgaa gtatggtaac 600  
 gaaatcaaaa atcgcaacga cgaatttctg ttctaccgta ataccgcct gactacggtc 660  
 gaaaacccgg aactgtcatt tgcgtcgaaa tatcgttacc cggccctggt tcgctccggc 720  
 tttaatccgg aatttctgac ctacatcagc aacgaaaagt ctaacgaaaa gacgcgtttc 780  
 gaagtgacct atacgcgcaa tcaggatata ctgaaaaaca agccgggcat tcaactcggc 840  
 cagccgatcc tggaacaaaa caaagatggc cagcgtttta ttgtcgtgta tgaagtggac 900  
 tggaaaaata agaccgttaa ggttgcgtaa aatatttctg atcagaacaa gccgtacaaa 960  
 gaaggt 966

<210> 22  
 <211> 322  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus*

5

<400> 22

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

10

ES 2 546 105 T3

Phe Gln Val Gln Arg Asn Pro Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro  
 115 120 125  
 Lys Asn Lys Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser  
 130 135 140  
 Leu Gly Gly Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser  
 145 150 155 160  
 Asn Ser Tyr Ser Lys Ser Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr  
 165 170 175  
 Ile Ala Ser Gly Lys Asn Asn Asn Arg His Val His Trp Ser Val Val  
 180 185 190  
 Ala Asn Asp Leu Lys Tyr Gly Asn Glu Ile Lys Asn Arg Asn Asp Glu  
 195 200 205  
 Phe Leu Phe Tyr Arg Asn Thr Arg Leu Ser Thr Val Glu Asn Pro Glu  
 210 215 220  
 Leu Ser Phe Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly  
 225 230 235 240  
 Phe Asn Pro Glu Phe Leu Thr Tyr Ile Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu  
 245 250 255  
 Lys Thr Arg Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys  
 260 265 270  
 Asn Lys Pro Gly Ile His Tyr Gly Gln Pro Ile Leu Glu Gln Asn Lys  
 275 280 285  
 Asp Gly Gln Arg Phe Ile Val Val Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys  
 290 300  
 Thr Val Lys Val Val Glu Lys Tyr Ser Asp Gln Asn Lys Pro Tyr Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Gly

<210> 23  
 <211> 945  
 <212> ADN  
 <213> *Staphylococcus aureus*  
 <400> 23

ES 2 546 105 T3

gcaagctcgt atgcggaaat caaaagcaag atcaccaccg tctcagaaaa gaacctggat	60
ggcgacacca agatgtacac cċgtaccgcg accacgagcg atacggaaaa gaaaattagc	120
cagtctctgc aatttaattt cctgaccgaa ccgaactacg acaaagaaac ggtgtttatt	180
aaagccaagg gcaccatcgg cagcggctctg aaaattctga atccgaacgg ctactggaac	240
agcaccctgc gttggccggg tagttattcc gtttcaattc agaacgtcga tgacaacaat	300
aactcaacca atgtcacgga ttttgcaccg aaaaaccaag acgaatcgcg tgaagtgaaa	360
tatacctacg gctataagac gggcggtgat ttcagtatca atcgcggcgg tctgaccggt	420
aacatcacga aggaaaagaa ctactcggaa accatcagct accagcaacc gtcttatcgt	480
accctgattg atcagccgac cacgaataaa ggcgctcgcgt ggaaggtgga agcccatagc	540
atcaataaca tgggtcatga tcacaccctg caactgacga acgactctga tgaccgctg	600
aaatctgaaa tttttagtct gaccgcgaat ggcaacctgt gggcaaaaga taatttcacg	660
ccgaaaaaca agatgccggt gaccgtttcc gaaggcttta atccggaatt tctggctgtt	720
atgtcccatg ataaaaacga caaaggtaag tcacgtttca tcgtccacta taaacgctcg	780
atggatgact ttaaactgga ttggaataag catggcttct ggggttactg gagtggtgaa	840
aaccacgttg accagaaaga agaaaagctg tccgccctgt atgaagtgga ttggaaaacg	900
cacgacgtta aactgattaa gaccatcaac gataaagaac agaag	945

<210> 24  
 <211> 315  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus*  
 <400> 24

5

ES 2 546 105 T3

Ala Ser Ser Tyr Ala Glu Ile Lys Ser Lys Ile Thr Thr Val Ser Glu  
 1 5 10 15

Lys Asn Leu Asp Gly Asp Thr Lys Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr  
 20 25 30

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

Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly  
 50 55 60

Thr Ile Gly Ser Gly Leu Lys Ile Leu Asn Pro Asn Gly Tyr Trp Asn  
 65 70 75 80

Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val  
 85 90 95

Asp Asp Asn Asn Asn Ser Thr Asn Val Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn  
 100 105 110

Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly  
 115 120 125

Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly Gly Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys  
 130 135 140

ES 2 546 105 T3

Glu Lys Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg  
 145 150 155 160  
 Thr Leu Ile Asp Gln Pro Thr Thr Asn Lys Gly Val Ala Trp Lys Val  
 165 170 175  
 Glu Ala His Ser Ile Asn Asn Met Gly His Asp His Thr Arg Gln Leu  
 180 185 190  
 Thr Asn Asp Ser Asp Asp Arg Val Lys Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr  
 195 200 205  
 Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys Asp Asn Phe Thr Pro Lys Asn Lys  
 210 215 220  
 Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly Phe Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val  
 225 230 235 240  
 Met Ser His Asp Lys Asn Asp Lys Gly Lys Ser Arg Phe Ile Val His  
 245 250 255  
 Tyr Lys Arg Ser Met Asp Asp Phe Lys Leu Asp Trp Asn Lys His Gly  
 260 265 270  
 Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu Asn His Val Asp Gln Lys Glu Glu  
 275 280 285  
 Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val Asp Trp Lys Thr His Asp Val Lys  
 290 295 300  
 Leu Ile Lys Thr Ile Asn Asp Lys Glu Gln Lys  
 305 310 315

<210> 25  
 <211> 954  
 <212> ADN  
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 25

gactcacagg accaaaacaa aaaggaacac gttgataagg cacagcagaa agacaagcaa 60  
 gatagacca agaaaggcaa aaacgttgcg gccccgatg acgtcggcaa aaacggcaag 120  
 gtgaccaaac gtacggaaag cgaatacgat gaaaagacca acatcctgca gaacctggaa 180  
 ttttaattca tcgatgacct gacctacgat aaagacgtcc tgctggtgaa aaagcaaggc 240  
 agtattcatt ccaacctgaa gttcgaaagt cacaagaag aaaagaacag cacctggctg 300  
 aaatatccgt cagaatacca tgttgatttc caggtcaagc gtaaccgaa aaccgaaatt 360  
 ctggaccaac tgccgaaaaa taagatcagt acggcaaaag tggattcaac cttttcgtat 420  
 acgctgggcg gtaaattcga ctccattaa gccatcggtc gcaatagctc taacagctat 480

5

10

ES 2 546 105 T3

tctcagacca tttcgtataa tcagcaaac tacgatacga tcgcgagcgg caaaaacaat 540  
 aactggcatg tgcaactggtc tgttattgcc aacgatctga agtatggcgg tgaagttaa 600  
 aatcgtaacg acgaatttct gttctaccgt aacacccgca cgagttccgt tgataatccg 660  
 gaatcatcgt ttgcagctaa atatcgttac ccggcactgg tccgcagtgg ttttaatccg 720  
 gaatttctga cctatctgag caacgaaaag tctaataaaa aaacgcagtt tgaagtgacc 780  
 tatacgcgta accaagatat cctgaaaaat agcccgggcc tgcattacgc tccgccgatt 840  
 ctggaaaaga acaaggttgg tcaccgcttt atcgtcacct atgaagtgga ttggaaaaat 900  
 aagacggtga aggtggttga caaatactct gatgaccagc cgttccgca aggt 954

<210> 26  
 <211> 318  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus*

5

<400> 26

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ala Gln Gln  
 1 5 10 15  
 Lys Asp Lys Gln Asp Ser Thr Lys Lys Gly Lys Asn Val Ala Ala Pro  
 20 25 30  
 Asp Asp Val Gly Lys Asn Gly Lys Val Thr Lys Arg Thr Glu Ser Glu  
 35 40 45  
 Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Glu Phe Asn Phe Ile  
 50 55 60  
 Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asp Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly  
 65 70 75 80  
 Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn  
 85 90 95  
 Ser Thr Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val  
 100 105 110  
 Lys Arg Asn Pro Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys  
 115 120 125  
 Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Thr Leu Gly Gly  
 130 135 140  
 Lys Phe Asp Ser Ile Lys Gly Ile Gly Arg Asn Ser Ser Asn Ser Tyr  
 145 150 155 160  
 Ser Gln Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser  
 165 170 175

10



ES 2 546 105 T3

Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp  
 180 185 190

Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Phe Leu Phe  
 195 200 205

Tyr Arg Asn Thr Arg Thr Ser Ser Val Asp Asn Pro Glu Ser Ser Phe  
 210 215 220

Ala Ala Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro  
 225 230 235 240

Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln  
 245 250 255

Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Ser Pro  
 260 265 270

Gly Leu His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Val Gly His  
 275 280 285

Arg Phe Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys  
 290 295 300

Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asp Gln Pro Phe Arg Glu Gly  
 305 310 315

<210> 27  
 <211> 927  
 <212> ADN  
 <213> *Staphylococcus aureus*  
 <400> 27

5

ES 2 546 105 T3

```

aaaatcaaat cggaatcac gcaagttagc gaacagaata tcgacggcaa tacgaagatg      60
tttaccgca cggaacgac ctcggatagc cagaaaaaga tcagccagtc tctgcaattt      120
aacttctga ccgaaccgaa ctacgacaag gaaacggtgt tcatcaaggc aaagggcacc      180
atcggctctg gtctgaaaat tctggaccgc aacggctact ggaatagtag cctgcgttgg      240
ccgggtagtt attccgtgtc aatccagaac gttgataaca ataccaatac gaaggttacg      300
gattttgccc cgaaaaacca agacgaaacc cgcgaagtca agtataccta cggctataaa      360
acgggcggtg atttctcgat tagcccgggc ggtattaccg gtaacatcac gaaagaacgt      420
aattattctg aaaccatcag ttaccagcaa ccgagttatc gcaccctgat tgaccagccg      480
gcgacgaata agggcggttg ttggaaagtc gaagccatc tgatcaacaa tatgggccat      540
gatcacaccc gtcaactgac gaacgattcc gacaatcgcg tgggctcaga aatttttacc      600
ctgacgcgta acggtaatct gtgggcgaaa gataacttca cgccgaaaaa taagatgccg      660
gtcaccgtgt ccgääggcct taaccgggaa tttctggccg ttatgctgca tgataaaaag      720
gacaaaggca agagcaaatt tgtggttcac tataaacgta cgatggatga ctttaaaatc      780

gattggatgc gccatggcct ctggggttac tggaccggtg aaaatcacgt tgaccagaag      840
gaagaaaaac tgtctgcact gtatgaagtc gattggaaaa ccacgacgt gaagttcatt      900
aaagctctgg atgacaaaga aaagaaa                                     927

```

```

<210> 28
<211> 309
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<400> 28

```

5

ES 2 546 105 T3

Lys Ile Lys Ser Glu Ile Thr Gln Val Ser Glu Gln Asn Ile Asp Gly  
 1 5 10 15  
 Asn Thr Lys Met Phe Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys  
 20 25 30  
 Lys Ile Ser Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr  
 35 40 45  
 Asp Lys Glu Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly  
 50 55 60  
 Leu Lys Ile Leu Asp Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp  
 65 70 75 80  
 Pro Gly Ser Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asn Asn Thr Asn  
 85 90 95  
 Thr Lys Val Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Thr Arg Glu  
 100 105 110  
 Val Lys Tyr Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Ser  
 115 120 125  
 Pro Gly Gly Ile Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Arg Asn Tyr Ser Glu  
 130 135 140  
 Thr Ile Ser Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Ile Asp Gln Pro  
 145 150 155 160  
 Ala Thr Asn Lys Gly Val Gly Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn  
 165 170 175  
 Asn Met Gly His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asn  
 180 185 190  
 Arg Val Gly Ser Glu Ile Phe Thr Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp  
 195 200 205  
 Ala Lys Asp Asn Phe Thr Pro Lys Asn Lys Met Pro Val Thr Val Ser  
 210 215 220

ES 2 546 105 T3

Glu Gly Phe Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Lys  
225 230 235 240

Asp Lys Gly Lys Ser Lys Phe Val Val His Tyr Lys Arg Thr Met Asp  
245 250 255

Asp Phe Lys Ile Asp Trp Met Arg His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Thr  
260 265 270

Gly Lys Asn His Val Asp Gln Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr  
275 280 285

Glu Val Asp Trp Lys Thr His Asp Val Lys Phe Ile Lys Ala Leu Asp  
290 295 300

Asp Lys Glu Lys Lys  
305

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo con neutralización cruzada que neutraliza la toxina alfa (Hla) y al menos una de las toxinas de dos componentes de *Staphylococcus aureus*, donde el anticuerpo comprende al menos un sitio de unión poliespecífico que se une a la toxina alfa (Hla) y que se une a al menos una de las toxinas de dos componentes de *Staphylococcus aureus*.
- 10 2. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha toxina de dos componentes se selecciona del grupo que consiste en pares afines y no afines de componentes R y L de hemolisinas gamma, toxinas PVL y toxinas de tipo PVL, preferentemente cualquiera de HlgAB, HlgCB, LukSF, LukED, LukGH, LukS-HlgB, LukSD, HlgA-LukD, HlgA-LukF, LukG-HlgA, LukEF, LukE-HlgB, HlgC-LukD o HlgC-LukF.
- 15 3. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho sitio de unión se une a al menos dos o al menos tres toxinas de dos componentes, preferentemente a al menos dos o tres de cualquiera de HlgAB, HlgCB, LukSF y LukED, preferentemente HlgAB, HlgCB, LukSF y LukED.
- 20 4. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un anticuerpo monoclonal de longitud completa o un fragmento de anticuerpo del mismo que comprende al menos un dominio de anticuerpo que incorpora el sitio de unión, preferentemente, que tiene una afinidad para unirse a cada una de las toxinas con una Kd menor de  $10^{-8}$  M, preferentemente menor de  $10^{-9}$  M.
- 25 5. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el anticuerpo comprende las seis secuencias de CDR de un anticuerpo denominado #AB-24, comprendiendo dicho anticuerpo denominado #AB-24
  - (a) una cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-LC cuya secuencia codificante está incluida en la célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26748; e
  - (b) una cadena pesada de anticuerpo denominada #AB-24-HC cuya secuencia codificante está incluida en la célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26747.
- 30 6. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el anticuerpo comprende
  - (a) una cadena ligera de anticuerpo producida por una célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26748; e
  - (b) una cadena pesada de anticuerpo producida por una célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26747;
- 35 7. Una célula hospedadora que comprende
  - (a) un casete de expresión que codifica una cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-LC, estando dicha secuencia codificante incluida en la célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26748; y
  - (b) un casete de expresión que codifica una cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-HC, estando dicha secuencia codificante incluida en la célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26747.
- 40 8. Método para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que una célula hospedadora de acuerdo con la realización 7 se cultiva o se mantiene en condiciones para producir dicho anticuerpo.
- 45 9. Un método para identificar un anticuerpo protector candidato, que comprende:
  - (a) proporcionar una muestra que contiene un anticuerpo o célula productora de anticuerpos; y
  - (b) evaluar la competición cruzada de un anticuerpo presente en o producido por la muestra, denominándose el anticuerpo #AB-24, por la unión a la toxina alfa y a al menos una toxina de dos componentes de *Staphylococcus aureus*, donde la competición cruzada identifica al anticuerpo como un anticuerpo protector candidato, comprendiendo dicho anticuerpo denominado #AB-24
    - 50 i) una cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-LC, estando dicha secuencia codificante incluida en la célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26748; y
    - 55 ii) una cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-HC, estando dicha secuencia codificante incluida en la célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26747.
- 60 10. Un método para identificar un anticuerpo protector candidato, que comprende:
  - (a) proporcionar una muestra que contiene un anticuerpo o célula productora de anticuerpos; y
  - (b) evaluar la unión de un anticuerpo presente en o producido por la muestra a la toxina alfa y a al menos una toxina de dos componentes de *Staphylococcus aureus*, donde una reacción positiva entre el anticuerpo y las toxinas
   - 65 identifica al anticuerpo como un anticuerpo protector candidato.

11. Un método para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende
- (a) proporcionar un anticuerpo protector candidato identificado de acuerdo con la definición 19 o 20; y
  - (b) producir un anticuerpo monoclonal, o una forma humanizada o humana del anticuerpo protector candidato, o un derivado del mismo que compite de forma cruzada con el anticuerpo denominado #AB-24 por la unión a la toxina alfa y a al menos una toxina de dos componentes de *Staphylococcus aureus*, comprendiendo dicho anticuerpo denominado #AB-24
    - i) una cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-LC, estando dicha secuencia codificante incluida en la célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26748; y
    - ii) una cadena ligera de anticuerpo denominada #AB-24-HC, estando dicha secuencia codificante incluida en la célula hospedadora depositada con el número de depósito DSM 26747.
12. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el tratamiento de un sujeto con riesgo de padecer o que padece una infección por *S. aureus*, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo para limitar la infección en el sujeto, para mejorar un estado patológico debido a dicha infección o para inhibir la patogénesis de la neumonía por *S. aureus*.
13. Preparación farmacéutica de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende preferentemente una formulación parenteral o para la administración en la mucosa, que contiene opcionalmente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. Anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso diagnóstico para detectar cualquier infección por *S. aureus*, incluyendo infecciones por SARM (*S. aureus* resistente a meticilina) que producen un alto nivel de toxinas, tales como neumonía necrotizante, y la producción de toxinas en furunculosis y carbunculosis.
15. Preparación de diagnóstico de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que contiene opcionalmente el anticuerpo con un marcador y/o un reactivo de diagnóstico adicional con un marcador.

Fig. 1

10 subunidades de toxina funcionales producidas y usadas para la exploración de mAb

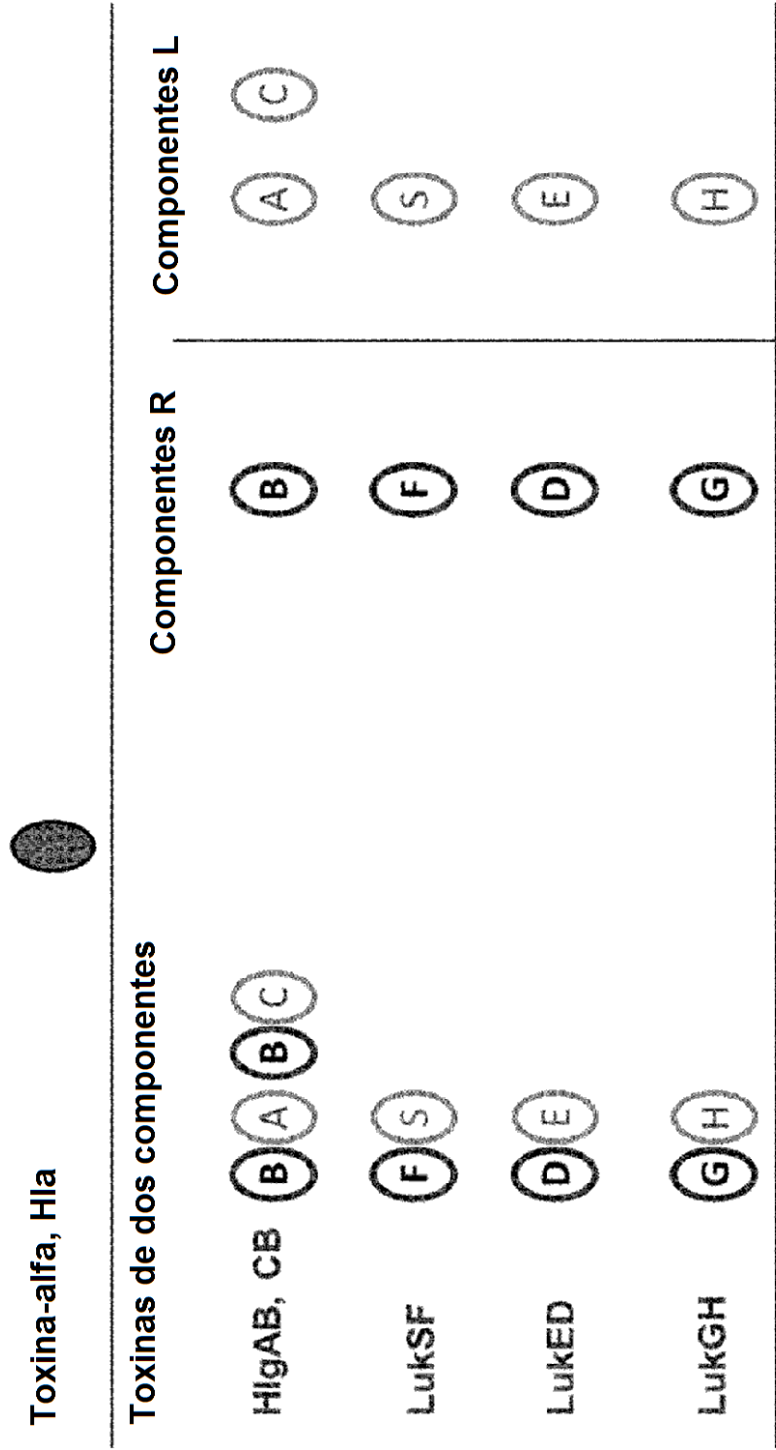


Fig. 2

A

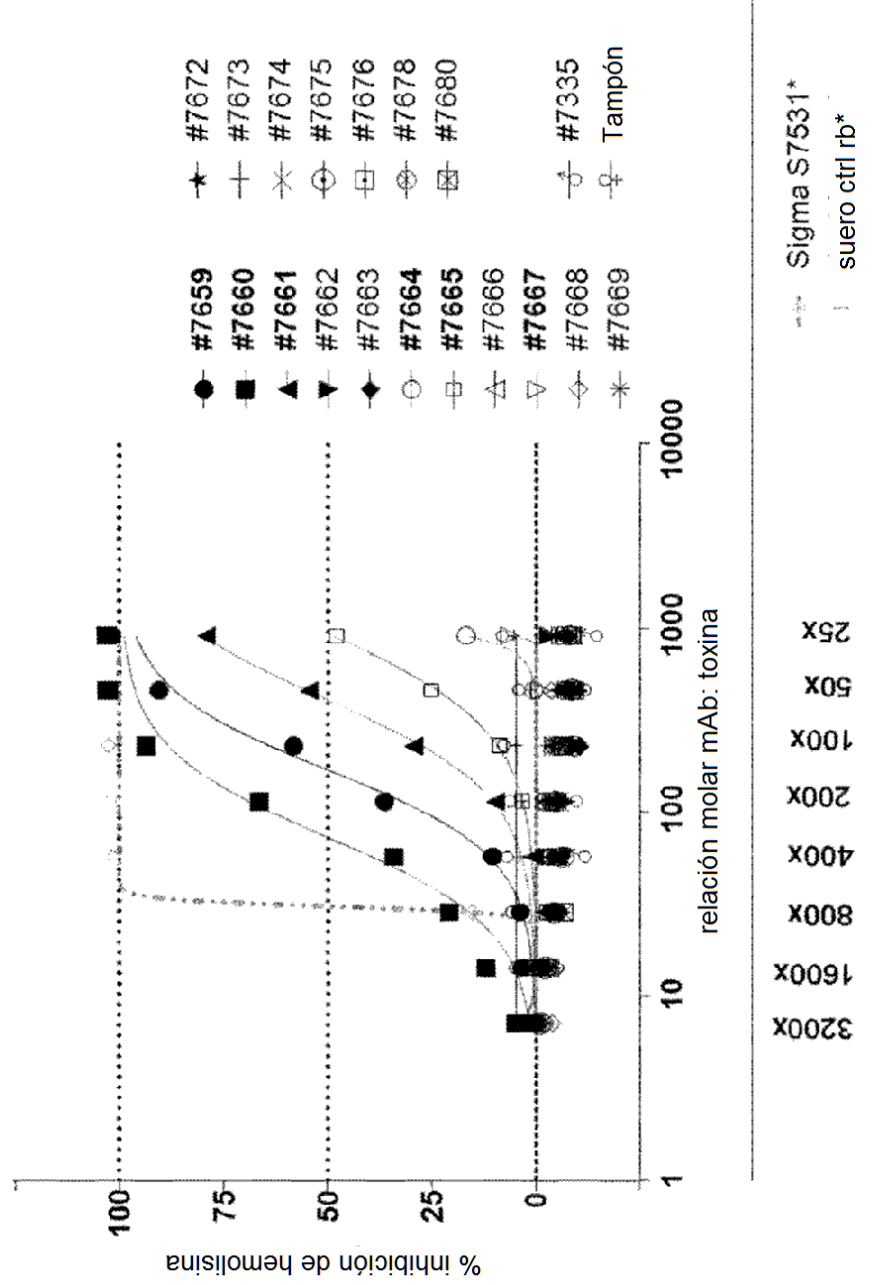




Fig. 2

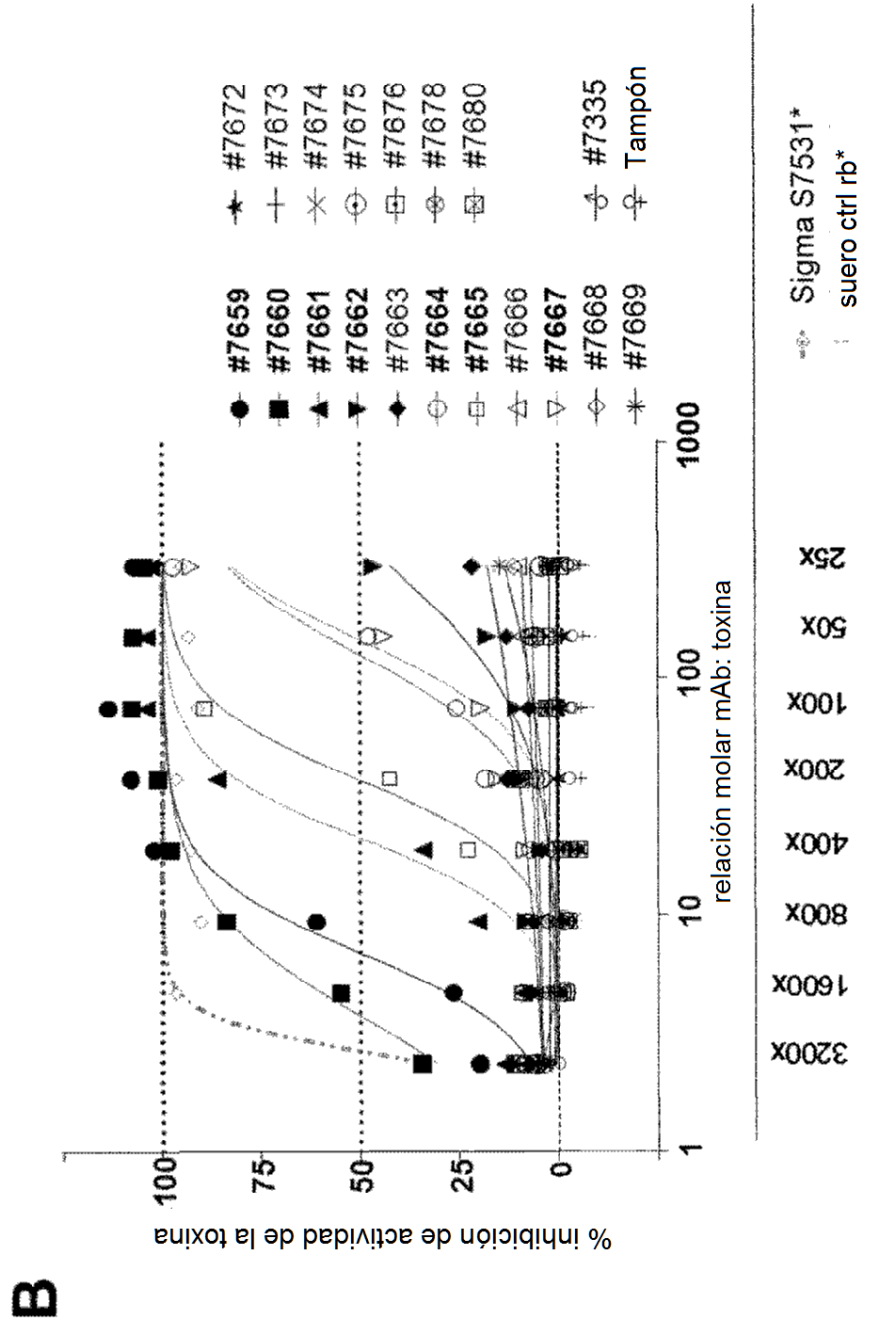


Fig. 3

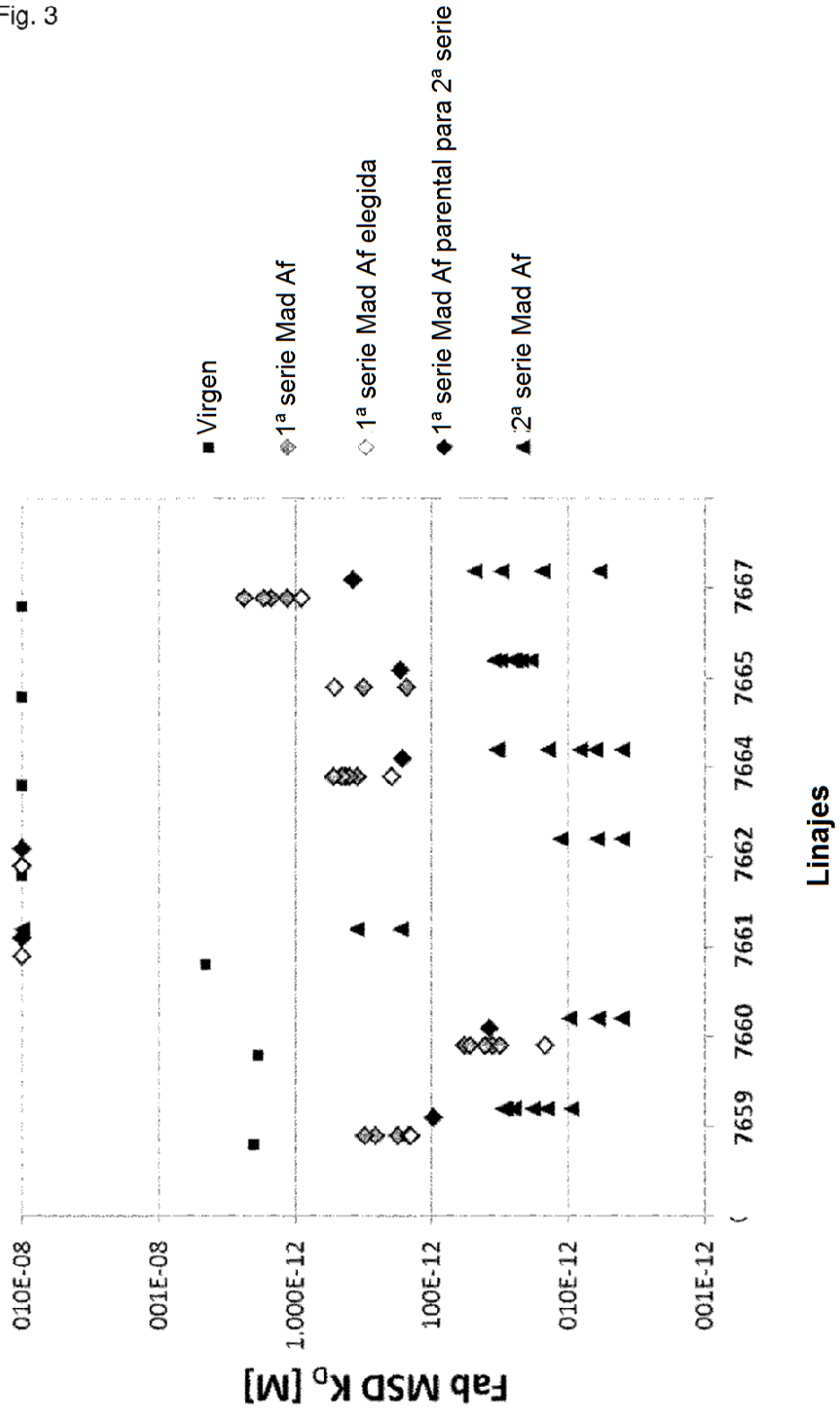


Fig. 4

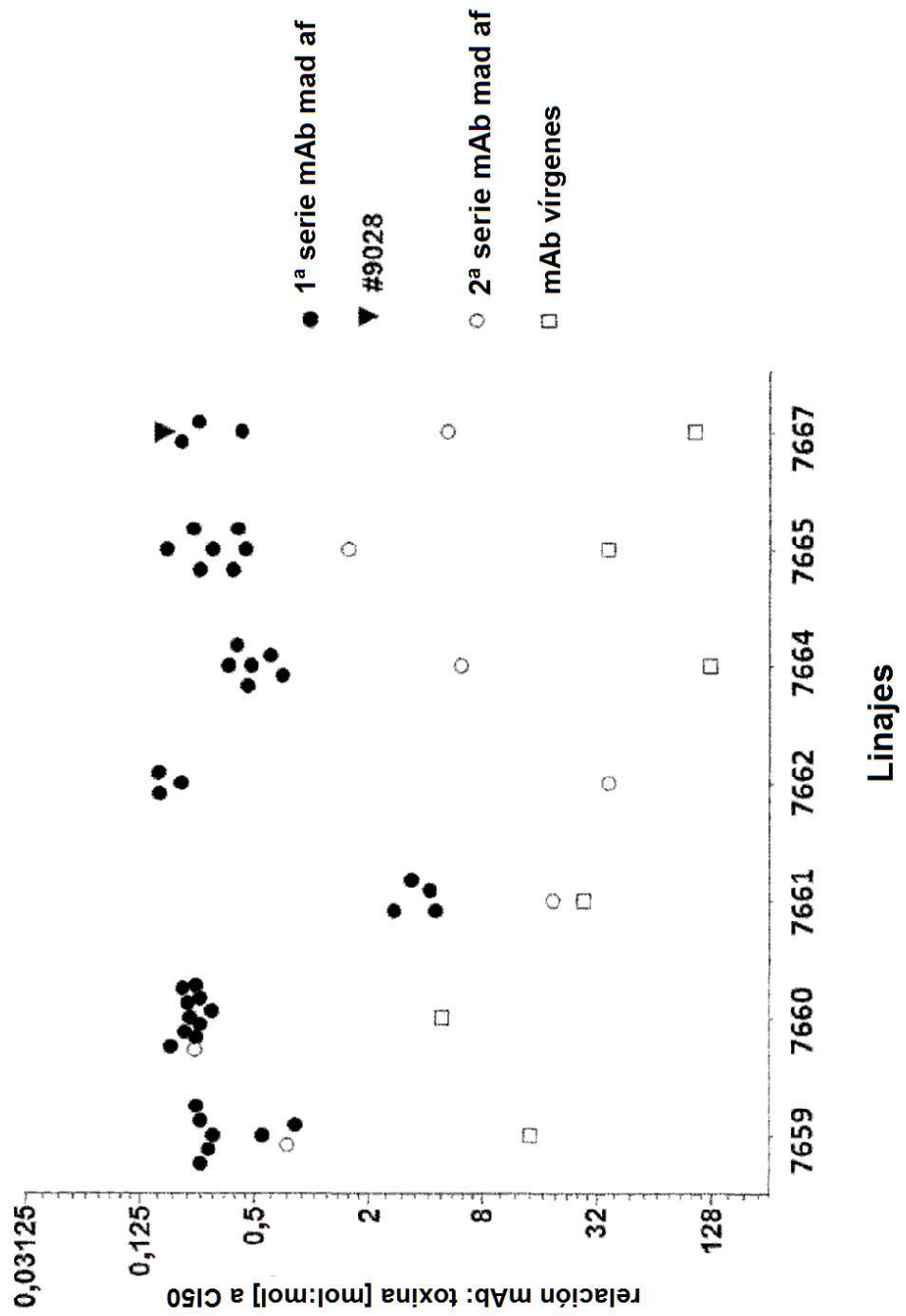


Fig. 5

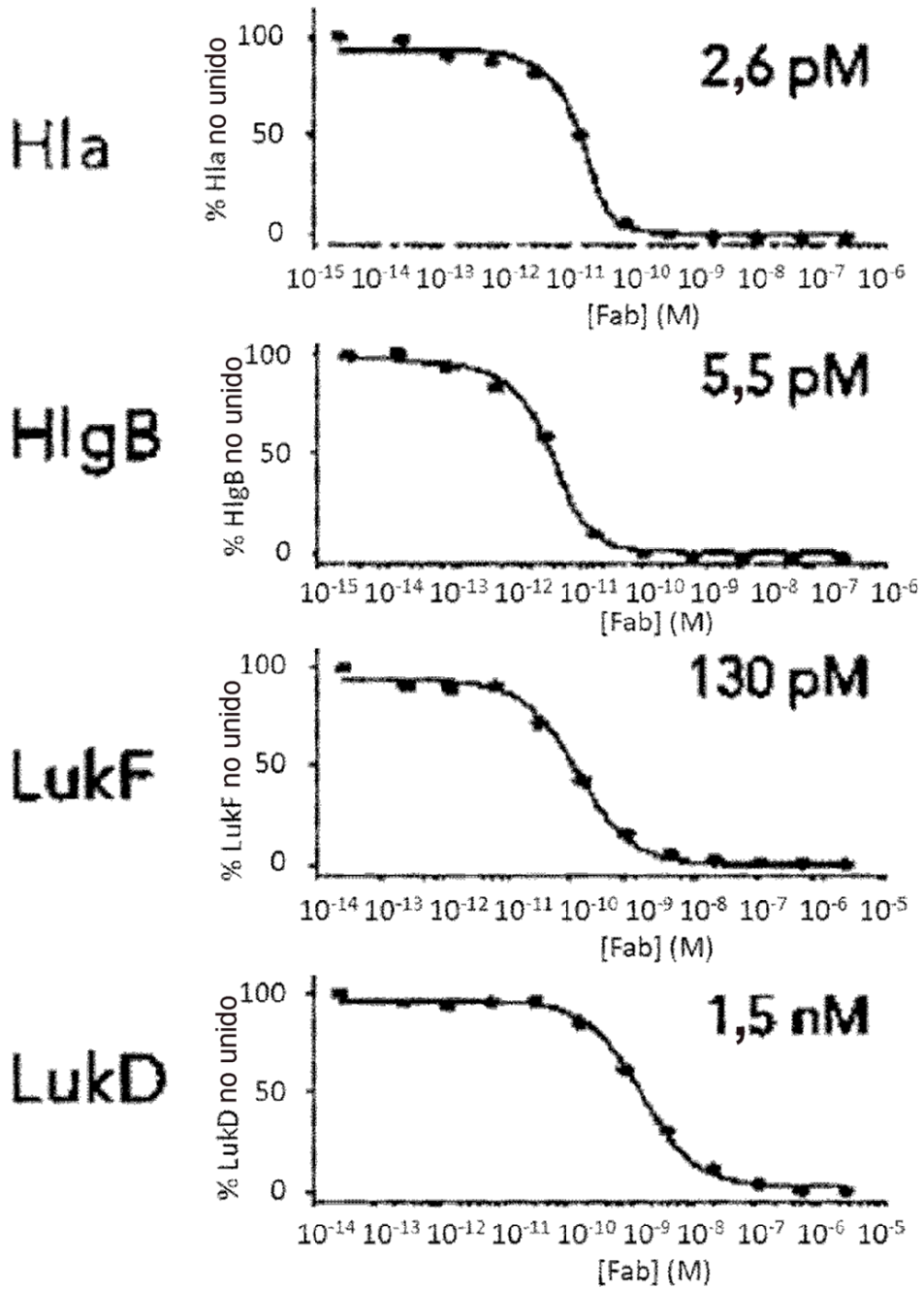


Fig. 6

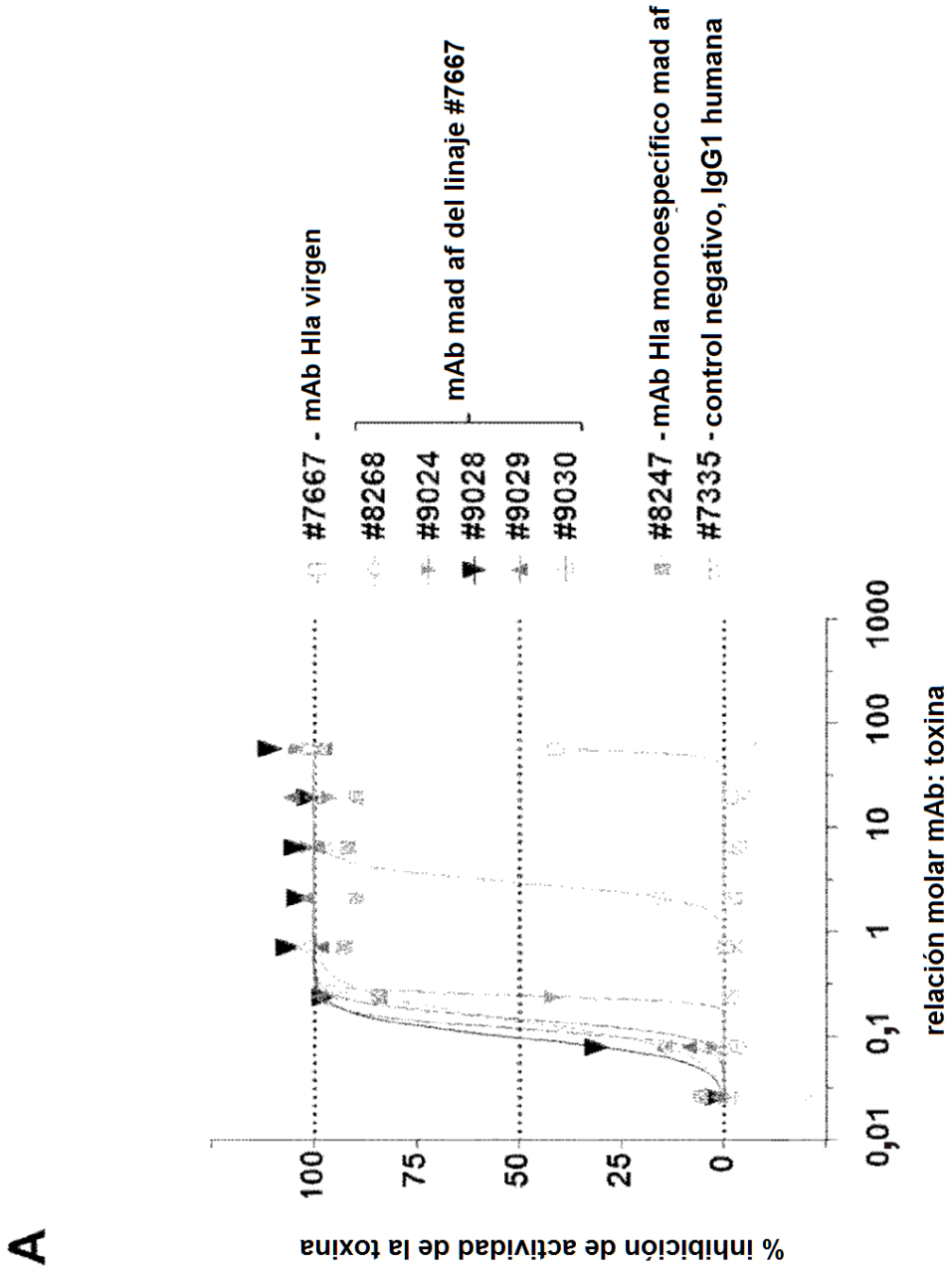


Fig. 6

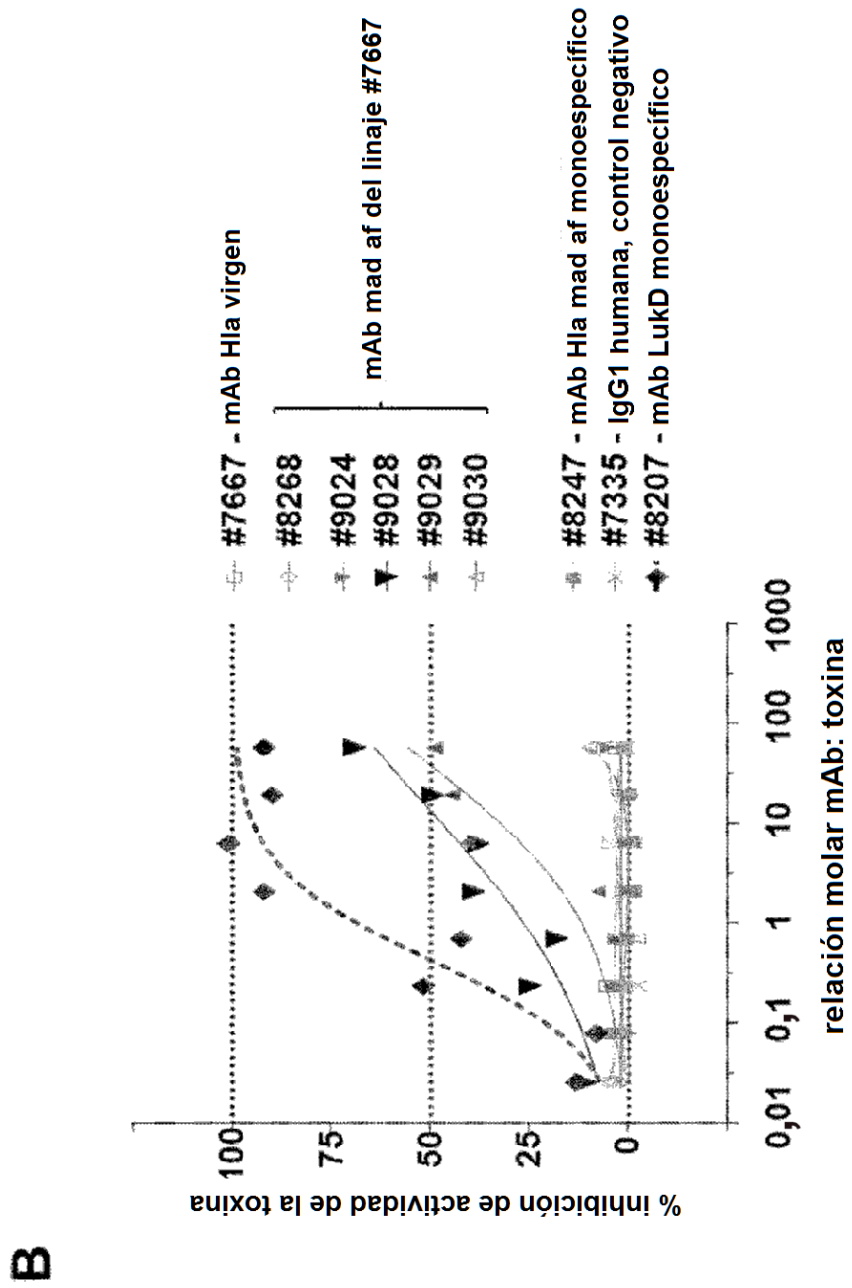
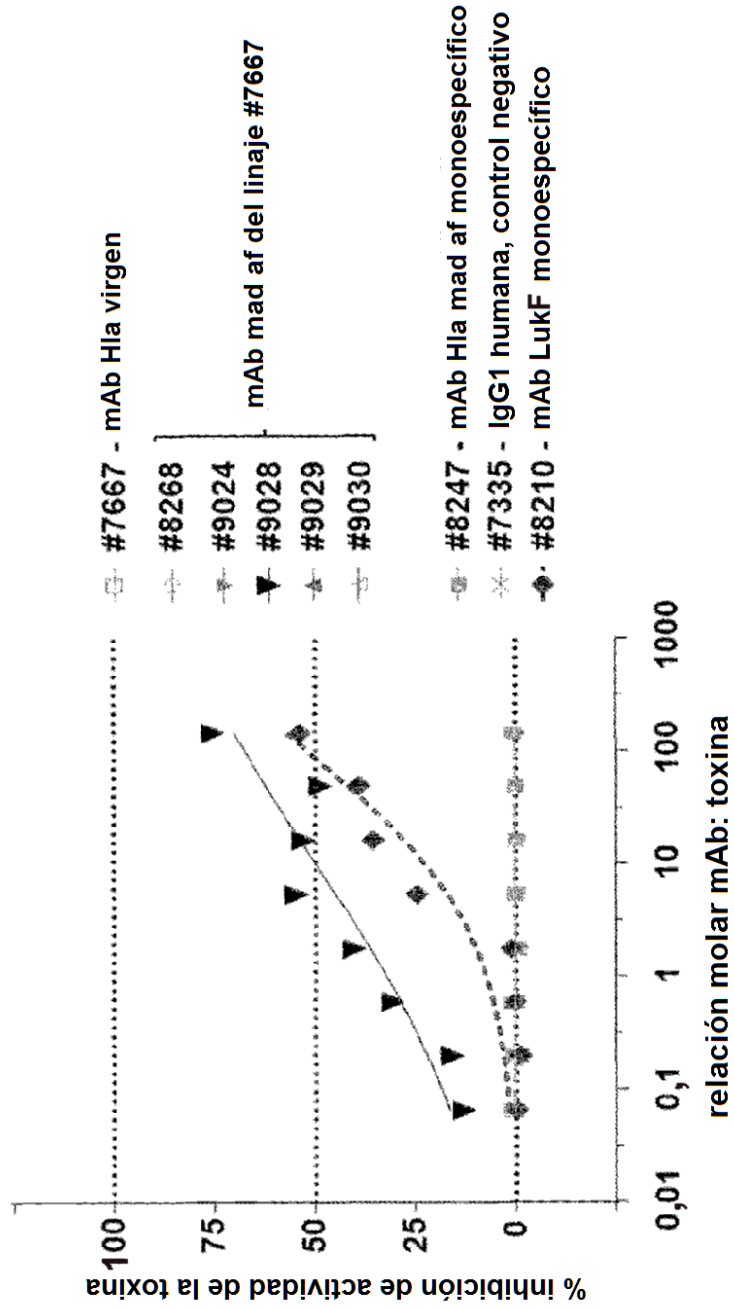


Fig. 6

C



**CUALQUIER REFERENCIA A LAS FIGURAS 6D, 7A Y 7B  
DEBE CONSIDERARSE INEXISTENTE**



Fig. 7

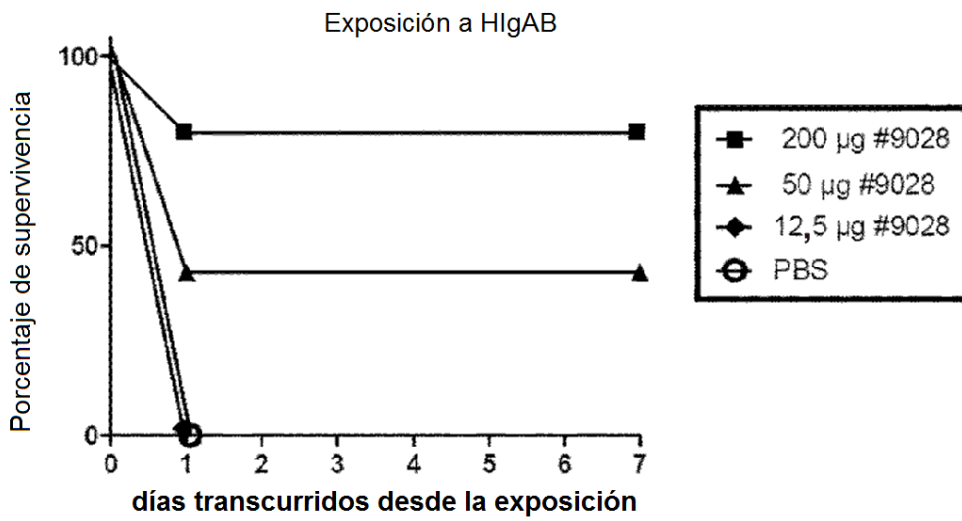
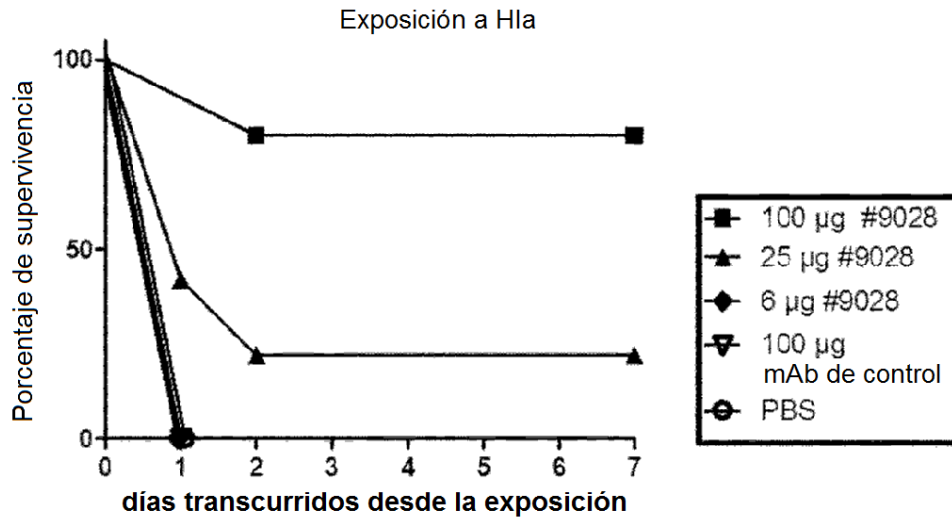


Fig. 8

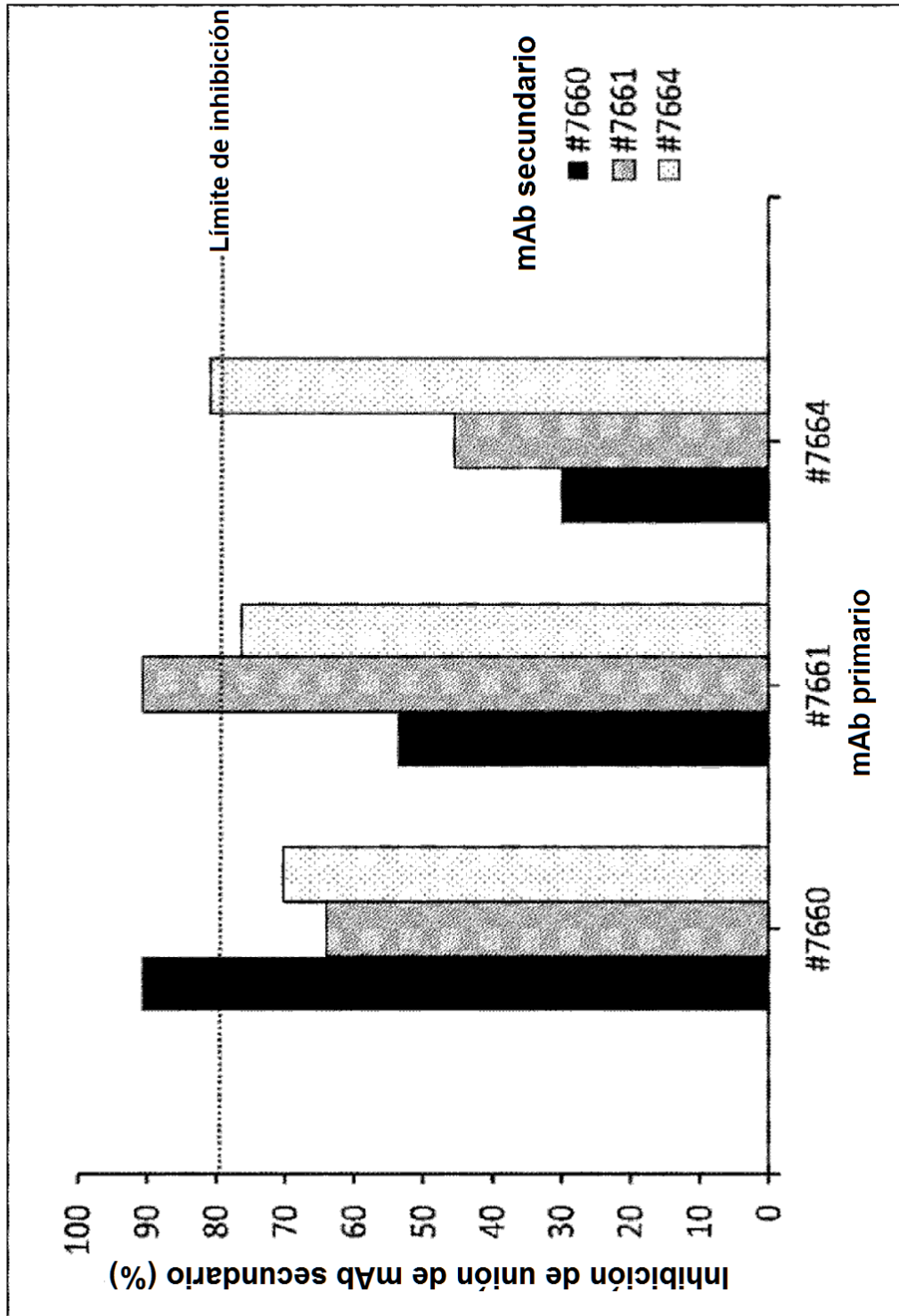


Fig. 9

SEC ID N°: 1 Secuencia de nucleótidos de Hla

GCCGACAGCGACATCAACATCAAAACGGGCACGACGGACATTGGCTCAAATACGACGGTGAAAAC  
 GGGCGATCTGGTTACCTATGACAAAGAAAACGGCATGCATAAAAAAGTGTTTTATAGTTTCATCGAT  
 GACAAAACCAACAACAAAAACTGCTGGTCATTTCGTACCAAAGGCACGATCGCAGGCCAGTATCGC  
 GTGTACAGCGAAGAAGGCGCTAATAATCAGGTCTGGCATGGCCGTCGGCTTTAAAGTTCAGCTG  
 CAACTGCCGGATAACGAAGTCGCGCAAATTAGCGACTATTACCCGCGTAACTCTATCGATACCAA  
 GAATACATGTCTACCCTGACGTACGGCTTCAACGGTAATGTTACCGGCGATGACACGGGTAAAATT  
 GGCGGTCTGATCGGCGCCAACGTGAGCATTGGTCATACCCTGAAATATGTTTCAGCCGGACTTTAAA  
 ACCATCCTGGAATCTCCGACGGATAAAAAAGTGGGCTGGAAAGTTATCTTCAACAACATGGTTAAC  
 CAGAACTGGGGTCCGTATGATCGTGACTCATGGAACCCGGTCTACGGCAATCAACTGTTTATGAAA  
 ACCCGCAACGGTTCGATGAAAGCGGCCGATAACTTCCTGGACCCGAATAAAGCGAGCTCTCTGCT  
 GAGTTCGGGCTTGTAGTCCGGACTTCGCGACCGTGATTACGATGGATCGCAAAGCCTCCAAACAGCA  
 AACCAATATTGATGTCATCTATGAACGTGTGCGCGATGACTACCAGCTGCACTGGACCAGCACGAA  
 CTGGAAGGTACCAATACGAAAGATAAATGGATTGACCGCTCCTCGGAACGCTACAAAATTGACTG  
 GAAAAAGAAGAAATGACGAAC

SEC ID N°: 2 Secuencia de aminoácidos de Hla

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTDKENGMMHKKVYFSFIDDKNHKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEE  
 GANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANV  
 SIGHTLKYVQPDFKTIESTDCKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAA  
 DNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWID  
 RSSERYKIDWEKEEMTN

SEC ID N°: 3 Secuencia de nucleótidos de LukS

GACAACAACATTGAAAACATTGGTGATGGCGCAGAAGTGGTGAAACGCACGGAAGATACCTCAAGC  
 GATAAATGGGGTGTGACGCAGAACATTCAGTTCGATTCGTCAAAGACAAAAAATACAACAAAGATG  
 CACTGATTCTGAAAATGCAAGGCTTTATCAACAGCAAAACCACGTACTACAACAAAAACACCGA  
 CCATATCAAAGCTATGCGTTGGCCGTTCCAGTACAATATCGGTCTGAAAACGAACGATCCGAATGTT  
 GACCTGATCAACTACCTGCCGAAAAACAAAATCGATTGAGTGAACGTTTCGCAAACCCTGGGCTAC  
 AATATCGGCGGTAACCTTAAATAGTGGCCCGTCCACCGGCGGTAACGGTAGCTTCAACTACTCTAAA  
 ACGATCAGTTACAACCAGCAAACTACATCTCTGAAGTCGAACGTCAGAACAGCAAATCTGTGCAAT  
 GGGGCATTAAGCGAATTCCTTTATCACCTCACTGGGCAAAATGTCGGGTGATGATCCGAACCTGT  
 TTGTGGGTTATAAACCGTACAGCCAGAACCCGCGCGATTATTTGTTCCGGACAATGAACTGCCGC  
 CGCTGGTCCATTCTGGCTTTAACCCGAGTTTCATTGCAACCGTGAGCCACGAAAAAGGCTCGGGTG  
 ATACCAGCGAATTTGAAATCACGTATGGTCGCAATATGGACGTTACCCATGCGACGCGTCCGACCA  
 CGCACTATGGCAACTCCTACCTGGAAGGTTACGTAATCACAAATGCCTTCGTTAACCGCAATTACAC  
 GGTGAAATACGAAGTCAACTGGAAAACGCACGAAATCAAAGTGAAGGTCATAAC

SEC ID N°: 4 Secuencia de aminoácidos de LukS

DNNIENIGDGAEVVKRTEDTSSDKWGVTONIQDFVFKDKKYNKDALILKMQGFINSKTTYNYKNTDHIK  
 AMRWPFQYNIKLTNDPNVDLINYLPKNKIDSVNVSQTLGYNIGGNFNSGPSTGGNGSFNYSKTIISYQ  
 QNYISEVERQNSKSVQWGIKANSFITSLGKMSGHDPNLFVGYKPYQNPRDYFVDPNELPPLVHSGFN  
 PSFIATVSHKSGSDTSEFEITYGRNMDVTHATRRTTHYGNSYLEGSRIHNAFVNRNYTVKYEVENWKTH  
 EIKVKGHN

Fig. 9 (continuación)

SEC ID Nº: 5 Secuencia de nucleótidos de LukF

GCGCAGCACATCACGCCGGTCTCCGAAAAAAGTTGACGACAAAATCACCTGTATAAAACGACG  
 GCCACGAGCGACTCTGACAAACTGAAAATTTCTCAGATCCTGACCTTCAACTTCATCAAAGATAAAA  
 GTTACGATAAAGACACGCTGATTCTGAAAGCGGCCGGTAACATCTATTCTGGCTACACCAAACCGA  
 ATCCGAAAGACACGATCAGCTCTCAATTCTACTGGGGTTCCAAATACAACATCTCAATCAACAGTGA  
 TTCCAACGACTCCGTCAATGTGGTTGATTATGCACCGAAAAACCAGAATGAAGAATTCCAAGTCCAG  
 CAAACCGTGGGCTATAGTTACGGCGGTGACATTAACATCTCGAATGGTCTGAGCGGCCGGTGGCAA  
 CGGCTCAAAATCGTTCAGCGAAACGATCAACTACAAACAGGAATCTTACCGTACCAGTCTGGATAA  
 ACGCAGCAATTTCAAGAAAATTGGTTGGGACGTTGAAGCGCATAAAAATCATGAACAATGGTTGGGG  
 CCCGTATGGCCGTGATTCTTATCACAGTACCTACGGTAACGAAATGTTTCTGGGCTCCCGCCAGTC  
 AAACCTGAATGCCGGTCAAAATTTCTGGAATACCATAAAATGCCGGTCTGAGCCGTGGTAACTTT  
 AATCCGGAATTCATTGGCGTCTGTGCGGCAAAACAGAACGCGAGCGAAAAAATCTAAAATCACCGTG  
 ACGTATCAGCGTGAATGGATCGCTACACCAACTTTTGAATCAACTGCATTGGATCGGCAACAAC  
 TACAAAGATGAAAACCGTGCCACCCACACGAGCATCTACGAAGTTGACTGGGAAAACACACGGTG  
 AAACCTGATTGATACCCAAAGTAAAGAAAAAACCCGATGTCG

SEC ID Nº: 6 Secuencia de aminoácidos de LukF

AQHITPVSEKKVDDKITLYKTTATSDSDLKISQILTFNFIKDKSYDKDTLILKAAGNIYSGYTKPNPKDTISS  
 QFYWGSKYNISINSDSNDSVNVVDYAPKNQNEEFVQVQTVGYSYGGDINISNGLSGGGNGSKSFSETI  
 NYKQESYRSLDKRTNFKKIGWDVEAHKIMNNGWGPYGRDSYHSTYGNEMFLGSRQSNLNAGQNFLE  
 YHKMPVLSRGNFNFPEFIGVLSRKQNAAKSKITVTYQREMDRYTNFWNQLHWIGNNYKIDENRATHTSI  
 YEVDWENHTVKLIDTQSKEKNPMS

SEC ID Nº: 7 Secuencia de nucleótidos de Luke

AATACGAATATCGAAAATATCGGCGACGGCGCAGAAGTTATCAAACGCGACGGAAGATGTCAGCAGC  
 AAAAAATGGGGTGTTACGCAGAATGTTGAGTTGATTTGTCGCAAGACAAAAATACAACAAAGATG  
 CACTGATTGTGAAAATGCAAGGCTTTATCAATTCTCGTACCAGTTTCTCCGACGTTAAAGGCAGTGG  
 TTATGAACTGACGAAACGCATGATTTGGCCGTTTTCAGTACAACATCGGTCTGACCACGAAAGATCC  
 GAACGTTTCCCTGATCAACTACCTGCCGAAAAACAAAATCGAAACCACGGACGTCGGCCAGACCCT  
 GGGTTACAACATTGGCGGTAATTTTCAAAGCGCTCCGTCTATCGGCGGTAACGGCTCATTCAATTA  
 CTCGAAAACCATTAGCTATACGCAGAAAAGTTACGTGTCCGAAGTTGATAAACAAAACTCAAATCG  
 GTCAAATGGGGCGTGAAAGCGAACGAATTTGTCACCCCGGATGGTAAAAAATCTGCCCATGACCGT  
 TACCTGTTTGTGCAGTCGCCGAATGGTCCGACGGGTAGCGCACGTGAATACTTTGCCCGGATAAT  
 CAGCTGCCGCGCTGGTGCAATCTGGCTTTAACCCGAGTTTTCATTACCACGCTGAGCCATGAAAAA  
 GGCAGCTCTGATACCTCCGAATTCGAAATTTTCATATGGTCGTAATCTGGACATCACCTACGCAACG  
 CTGTTTCCGCGTACCGGTATCTATGCAGAACGCAACACAACGCTTTTGTAAACCGCAATTTGTTG  
 TCCGCTACGAAGTGAAGTGGAAAACCCATGAATCAAAGTGAAGGCCATAAC

SEC ID Nº: 8 Secuencia de aminoácidos de Luke

NTNIENIGDGAIEVIKRTEDVSSKKWGVTONVQFDFVKDKKYNKDALIVKMQGFINSRFSFSDVKGSGYE  
 LTKPMIWPYQYNIPLTKDPNVSLINYLKPKNIETTDVGGTLGYNIGGNFQSAPSIIGNGSFNYSKTISYT  
 QKSYVSEVDKQNSKSVKWGVKANEFVTPDGKKSADRYLQVQSPNGPTGSAREYFAPDNQLPLVQS  
 GFNPSFITLSHEKGSSTSEFEISYGRNLDITYATLFPRTGIYAERKHNAFVNRNFVRYEVNWKTHEIK  
 VKGHN

Fig. 9 (continuación)

SEC ID Nº: 9 Secuencia de nucleótidos de LukD

GCCCAACACATTACGCCGGTCTCGGAAAAAAGTGGATGACAAAATCACGCTGTATAAAACGACG  
 GCAACCTCAGATAACGACAAACTGAACATTAGTCAGATCCTGACCTTCAACTTCATCAAAGATAAAT  
 CCTACGATAAAGACACGCTGGTGTCTGAAAGCGGCCGGCAACATTAATTCAGGTTACAAAAACCGA  
 ACCCGAAAGACTATAATTACTCGCAGTTTTATTGGGGCGGTAAATACAACGTCAGCGTGAGCTCTG  
 AATCTAACGATGCAGTCAATGTGGTTGACTATGCTCCGAAAAACCAGAATGAAGAATTTCAAGTGCA  
 GCAAACCCTGGGCTATAGCTACGGCGGTGATATTAACATCTCAAATGGCCTGTCGGGCGGTCTGAA  
 CGGTTTCGAAAAGCTTCTCTGAAACCATCAACTACAAACAGGAAAGCTACCGTACCACGATTGATCG  
 CAAAACGAACCATAAATCTATCGGCTGGGGTGTGAAGCGCACAAAATTATGAACAATGGCTGGGG  
 TCCGTATGGCCGTGATTCCTATGACCCGACCTACGGTAATGAACTGTTTCTGGGCGGTGCCAGAG  
 TTCCTCAAACGCGGGCCAAAATTTCTGCGACGCATCAGATGCCGCTGCTGGCACGTGGTAACTT  
 TAATCCGGAATTCATCAGTGTGCTGTCCACAAAACAAAACGATACCAAAAAATCTAAAATCAAAGTT  
 ACGTATCAACGTGAAATGGACCGCTACACCAACCAGTGAATCGCCTGCATTGGGTTGGTAACAAC  
 TACAAAACCAGAACACCGTTACGTTACCTCTACGTACGAAGTCGATTGGCAAAACCATACGGTC  
 AACTGATTGGCACGGACAGCAAAGAAACGAACCCGGGCGTC

SEC ID Nº: 10 Secuencia de aminoácidos de LukD

AQHITPVSEKKVDDKITLYKTTATSDNDKLNISQILTFNFIKDKSYDKDTLVLKAAGNINSGYKKPNPKDYN  
 YSQFYWGKYNVSVSSESNDAVNVDYAPKNQNEEFVQVQTLGYSYGGDINISNGLSGGLNGSKSFS  
 ETINYKQESYRTTIDRKTNHKISIGWVGEAHKIMNNGWGPYGRDSYDPTYGNELFLGGRQSSSNAGQNF  
 LPTHQMPLLARGNPNPEFISVLSHKQNDTKSKIKVITYQREMDRYTNQWNRLHWVGNKYKNQNTVTFT  
 STYEVDWQNHTVKLIGTDSKETNPGV

SEC ID Nº: 11 Secuencia de nucleótidos de HlgA

GAAAACAAAATCGAAGACATCGGCCAAGGTGCTGAAATCATCAAACGCACGCAAGACATCACGAGT  
 AAACGCCTGGCAATCACGCAGAATATTCAGTTTCGATTTTCGTGAAAGACAAAAATACAACAAAGATG  
 CACTGGTGGTTAAAATGCAAGGCTTTATCAGCTCTCGTACCACGTACAGCGATCTGAAAAATATCC  
 GTACATTAACGCATGATCTGGCCGTTCCAGTACAACATCAGTCTGAAAACCAAAGATCCAACGTG  
 GACCTGATTAATTACCTGCCGAAAAACAAAATCGATAGTGCGGACGTTTCCAGAAACTGGGCTAT  
 AACATTGGCGGTAATTTTCAATCAGCCCCGTGATCGGCGGTAGTGGTTCTTCAATTACTCAAAAA  
 CCATCTCGTACAACCAGAAAAATTACGTTACGGAAGTCGAAAGCCAAAACCTCTAAAGCGTGAAAT  
 GGGGTGTTAAAGCGAATTCATTTGTCACCCCGAACGGCCAGGTGTCGGCGTATGATCAGTACCTGT  
 TTGCACAAGACCCGACGGGTCCGGCAGCACGTGATTATTTTCGTTCCGGACAATCAGCTGCCGCCG  
 CTGATTCAAAGCGGCTTTAACCCGCTTTTCATCACCACGCTGTCCCATGAACGTGGCAAAGGTGAT  
 AAAAGCGAATTTGAAATTACCTATGGTCGCAACATGGATGCAACCTATGCTTACGTTACGCGTCATC  
 GCCTGGCAGTCGATCGTAAACACGACGCTTTCAAAAACCGCAATGTCACCGTCAAATACGAAGTCA  
 ACTGGAAAACGCACGAAGTCAAATCAAATCAATCACCCCGAAA

SEC ID Nº: 12 Secuencia de aminoácidos de HlgA

ENKIEDIGQGAELIKRTQDITSKRLAITQNIQDFVKDKKYNKDALVVKMQGFISSRTTYSDLKKYPYIKRMI  
 WPFQYNISLTKDSNVDLINYLPKNKIDSADVSQKLGYNIGGNFQSAPSIGGSGSFNYSKTI SYNQKNYV  
 TEVESQNSKGVKWKANSFVTPNGQVSAYDQYLFAQDPTGPAARDYFVPDNLPLLIQSGFNPSFIT  
 TLSHERGKGDKSEFEITYGRNMDATYAYVTRHRLAVDRKHDAFKNRNVTVKYEVNWKTHEVKIKSITPK

Fig. 9 (continuación)

SEC ID N°: 13 Secuencia de nucleótidos de HlgC

GCAAACGACACGGAAGACATCGGCAAAGGTTTCAGACATCGAAATCATCAAACGCACGGAAGACAA  
AACGAGCAATAAATGGGGTGTGACCCAGAACATTCAATTTCGATTTTCGTGAAAGACAAAAATACAAT  
AAAGATGCGCTGATTCTGAAAATGCAGGGCTTTATCAGCTCTCGTACCACGTACTACAACACTACAAGA  
AAACCAACCATGTTAAAGCCATGCGCTGGCCGTTCCAATACAACATCGGTCTGAAAACGAATGACA  
AATATGTCAGTCTGATTAACCTACCTGCCGAAAAATAAAATCGAATCGACCAACGTGAGCCAGACGCT  
GGGCTATAACATTGGCGGTAATTTTCAATCCGCACCGTCACTGGGCGGTAACGGTTCATTCAATTA  
CTCAAAATCGATCAGCTATACCCAGCAAACTACGTGTCTGAAGTTGAACAGCAAAATTCTAAAAGT  
GTCCTGTGGGGCGTGAAAGCGAATAGCTTTGCCACGGAATCTGGTCAGAAAAGTGCATTTGATTCC  
GACCTGTTTCGTGGGCTATAAACCGCATTCAAAAGATCCGCGTGACTACTTCGTGCCGGATTCCGAA  
CTGCCGCCGCTGGTTTCAGTCAGGTTTTAACCCGTCGTTTCATTGCTACCGTTAGTCACGAAAAAGGC  
AGTTCGGATACCTCCGAATTTGAAATTACGTATGGTCGTAATATGGACGTCACCCATGCAATCAAAC  
GCAGCAGCACTATGGCAACTCTTACCTGGATGGTCATCGTGTTCACAATGCTTTTGTCAACCGCA  
ATTATACGGTCAAATACGAAGTCAACTGGAAAACGCACGAAATCAAAGTCAAAGGTCAAAC

SEC ID N°: 14 Secuencia de aminoácidos de HlgC

ANDTEDIGKGSIEIIRKRTEDKTSNKWGVTONIQDFVFKDKKYNKDALILKMQGFSSRTTYNYKKTNHV  
KAMRWPFQYNIPLKTNKYVSLINYLKPKNKESTNVSQTLGYNIGGNFQSAPSLGGNGSFNYSKISYQ  
QNYVSEVEQNSKSVLWGVKANSFATESGQKSAFSDLVGVYKPHSKDPRDYFVPSLPLVQSGF  
NPSFIATVSHEKGSSTSEFEITYGRNMDVTHAIKRSTHYGNSYLDGHRVHNAFVNRNYTVKYEVNWKT  
HEIKVKGN

SEC ID N°: 15 Secuencia de nucleótidos de HlgB

GCGGAAGGCAAAATTACCCCGGTCTCGGTGAAAAAGTTGACGACAAAGTGACGCTGTATAAAACG  
ACGGCCACGGCTGATTCGGATAAATTTAAATTAGCCAGATCCTGACCTTCAACTTCATCAAAGATA  
AATCTTACGATAAAGACACCCCTGGTGCTGAAAGCAACGGGCAACATCAATAGCGGTTTTGTTAAAC  
CGAACCCGAATGATTACGACTTCTCAAACTGTATTGGGGCGCAAAATACAATGTTTCGATTAGCTC  
TCAGAGTAACGATTCCGTCAATGTGGTTGACTATGCTCCGAAAAACCAAAATGAAGAATTTAGGTTG  
CAAAACACCCCTGGGTTACACGTTCCGGCGGTGATATTTCAATCTCGAATGGCCTGAGTGGCGGTCTG  
AACGGAATACCGCGTTTTCCGAAACGATTAATAAACAGGAAAGCTACCGTACCACGCTGTCTC  
GCAACACCAATTATAAAAATGTCGGCTGGGGTGTGGAAGCCATAAAATCATGAACAATGGCTGGG  
GTCCGTATGGCCGTGACTCCTTTACCCGACGTACGGCAACGAACTGTTCTGCGAGGTGCGCCAG  
AGTTCGGCATATGCAGGTCAAATTTTATTGCCAGCATCAAATGCCGCTGCTGAGCCGTTCTAACT  
TTAATCCGGAATTCCTGTGAGTCTGTGCGACCCGCCAGGATGGCGCGAAAAATCTAAAATCACCG  
TTACGTACCAGCGTGAATGGACCTGTACCAATCCGCTGGAACGGCTTCTATTGGGCAGGTGCTA  
ACTACAAAACCTTCAAACCCGTACGTTCAAATCTACCTATGAAATCGATTGGGAAAACCAAAAGT  
CAAACCTGCTGGACACGAAAGAAACGAAAAATAATAA

SEC ID N°: 16 Secuencia de aminoácidos de HlgB

AEGKITPVSVKKVDKVTLYKTTATADSDKFKISQILTFNFIKDKSYDKDTLVKATGNINSGFVKPNPNDY  
DFSKLYWGAQYVNSISSQSNDSVNVVDYAPKNQNEEFQVQNTLGYTFGGDISISNGLSGGLNGNTAFS  
ETINYKQESYRTTSLRNTNYKNVWGWVEAHKIMNNGWGPYGRDSFHPTYGNELFLAGROSSAYAGQN  
FIAQHQMPLLSRSNPNPEFLSVLSHRQDGAKKSKITVYQREMDLYQIRWNGFYWAGANYKNFKTRTF  
KSTYEIDWENHKVLLDVKETENNK

Fig. 9 (continuación)

SEC ID N°: 17 Secuencia de nucleótidos de LukH USA300

AACTCGGCTCATAAAGATAGTCAGGATCAAAATAAAAAAGAACACGTGGATAAATCACAAACAGAAAG  
 AATAACGCAATGTACCAATAAAGATAAAAATAGCACCGCACCGGATGACATTGGCAAAAACGGTA  
 AAATCACCAAACGTACCGAAACGGTGTATGATGAAAAAACGAATATTCTGCAGAACCTGCAATTTGA  
 TTTTCATCGATGACCCGACCTACGACAAAAATGTGCTGCTGTTAAAAAACAGGGCAGCATTCAATCT  
 AACCTGAAATTCGAAAGTCACAAAGAAGAGAAAAACTCCAACCTGGCTGAAATATCCGTCAGAATACC  
 ATGTCGATTTCCAGGTGAAACGTAATCGCAAAACCGAAATTCTGGACCAACTGCCGAAAAACAAAAT  
 CAGTACCGCCAAAGTTGATAGTACGTTTTCTATAGCTCTGGCGGTAAATTCGACTCTACCAAAGGC  
 ATCGGTCTGACGAGTTCCAACCTACTCGAAAACCATCTCGTACAACCAGCAAAACTACGATACGA  
 TCGCAAGCGGCAAAAACAATAACTGGCATGTTCACTGGTCTGTCAATTGCTAACGATCTGAAATATGG  
 CGGTGAAGTTAAAAATCGCAACGACGAACTGCTGTTTTACCGTAATACCCGCATCGCGACGGTCCA  
 AAACCCGAAACTGTCAATTCGCGTCAAAATATCGTTACCCGGCCCTGGTGGCTCCGGTTTTAATCC  
 GGAATTCCTGACCTACCTGAGCAACGAAAAATCTAACGAAAAACGCAGTTCGAAGTCACTATAC  
 GCGTAATCAAGATATTCTGAAAAACCGTCCGGGCATTCACTACGCACCGCCGATCCTGGAGAAAA  
 CAAAGATGGTCAGCGCCTGATCGTGACCTATGAAGTTGACTGGAAAAACAAAACCGTGAAGTGGT  
 GGACAAATACTCGGACGACAATAAACCGTACAAGAAGG

SEC ID N°: 18 Secuencia de aminoácidos de LukH USA300

NSAHKDSQDQNKKEHVDKSSQKDKRNVTKDKNSTAPDDIGKNGKITKRTETVYDEKTNILQNLQDFI  
 DDPTYDKNVLVKKQGSIHNSLKFESHKEEKNSNWLKYPSEYHVDFQVKRNRKTEILDQLPKNKISTAKV  
 DSTFSSYSSGGKFDSTKIGIRTSNSYSKTISYNQQNYDTIASGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGEVKNR  
 NDELLFYRNTRIATVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVYTRNQDILKNRP  
 GIHYAPPILEKNKDGQRLLIVTYEVDWKNKTVKVVOKYSDDNKPYKEG

SEC ID N°: 19 Secuencia de nucleótidos de LukG USA300

AAAATCAACAGCGAAATCAAACAAGTCAGCGAAAAAATCTGGATGGCGATACGAAAATGTACACG  
 CGCACGGCAACCACGAGCGATTTCGAGAAAAACATCACCCAGAGCCTGCAATTTAATTTCTGACC  
 GAACCGAACTACGATAAAGAAACGGTGTTCATCAAAGCAAAAAGGCACCATCGGCTCAGGTCTGCGT  
 ATTCTGGACCCGAATGGCTACTGGAACCTCGACCCTCGCTGGCCGGGTAGCTATTCTGTGAGTATT  
 CAGAATGTTGATGACAACAATAACACCAACGTTACGGATTTTCTCCGAAAAATCAAGATGAAAGCC  
 GTGAAGTCAAATATACCTACGGCTATAAAACGGCGGGTGAATTTCTCTATCAATCGCGGCGGTCTGA  
 CCGGTAATATTACGAAAGAATCGAACTATAGCGAAACCATCTCCTACCAGCAACCGTCATATCGTAC  
 CCTGCTGGATCAGTCCACGTCACATAAAGGCGTTGGTTGAAAGTCGAAGCGCACCTGATCAATAA  
 CATGGGCCATGATCACACCCGTCAACTGACGAATGATAGCGACAACCCGACGAAATCTGAAATTTT  
 TAGTCTGACCCGCAATGGTAACCTGTGGGCGAAAGATAAATTACGCGGAAAGACAAAATGCCGGT  
 CACCGTGTCCGAAGGCTTTAATCCGGAATTCCTGGCGTTATGTCTCATGATAAAAAAGACAAAGG  
 TAAAAGTCAGTTCTGTGTTCACTACAAACGTTCCATGGATGAATTCAAAATCGACTGGAACCGCCAT  
 GGCTTCTGGGTTACTGGAGCGGTGAAAACCACTCGATAAAAAAGAAAGAAAACCTGTCTGCACTG  
 TATGAAGTGGACTGGAAAACCCACAATGTCAAATTCGTGAAAGTTCGAAATGATAATGAAAAAAA

SEC ID N°: 20 Secuencia de aminoácidos de LukG USA300

KINSEIKQVSEKNLDGDTKMYTRTATSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLRILDPN  
 GYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNTNVTDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGTGNITKE  
 SNYSETISYQQPSYRLLDQSTSHKGVGWKVEAHLINNMGHDHTRQLTNDSDNRTKSEIFSLTRNGNL  
 WAKDNFTPKDKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSQFVVHYKRSMDEFKIDWNRHGFWGYWSG  
 ENHVDKKEEKLALYEVDWKTNNVFKVVLNDNEKK

Fig. 9 (continuación)

SEC ID N°: 21 Secuencia de nucleótidos de LukH MRSA252

GCAAACAAGGACTCCCAGGACCAGACCAAAAAAGAACACGTGCGATAAAGCACAGCAGAAAGAAAA  
 GCGTAATGTCAACGATAAAGATAAAAATACCCCGGGCCCGGATGACATTGGCAAAAACGGCAAGGT  
 TACCAAACGTACCGTCAGTGAATATGACAAAAGAAACCAATATTCTGCAGAACCTGCAATTTGATTTT  
 ATCGATGACCCGACGTACGACAAAAATGTGCTGCTGGTTAAAAAGCAAGGTAGTATCCATTCCAAC  
 CTGAAGTTTGAAAGCCACCGTAATGAAACCAACGCGAGTTGGCTGAAATATCCGTCCGAATACCAT  
 GTCGATTTCCAGGTGCAACGCAATCCGAAAACGGAAATTCTGGACCAGCTGCCGAAAAACAAGATC  
 TCAACCGCAAAAAGTGGATTTCGACGTTTATTCCCTGGGCGGTAAATTGACAGCACCAAAAGGC  
 ATTGGTCGCACCAGCAGCAACAGCTACTCGAAGAGCATCTCTTACAACCAGCAAACTACGATACC  
 ATCGCAAGCGGCAAAAACAATAACCGTCATGTTCACTGGTCTGTGGTTGCTAATGATCTGAAGTATG  
 GTAACGAAATCAAAAATCGCAACGACGAATTTCTGTTCTACCGTAATACCCGCCTGAGTACGGTCG  
 AAAACCCGGAACGTGATTTGCGTCGAAATATCGTTACCCGGCCCTGGTTGCTCCGGCTTTAATC  
 CGGAATTTCTGACCTACATCAGCAACGAAAAGTCTAACGAAAAGACGCGTTTTGAAAGTGACCTATA  
 CGCGCAATCAGGATATCCTGAAAACAAGCCGGGCATTCACTACGGTCAGCCGATCCTGGAACAAA  
 ACAAAGATGGCCAGCGTTTTATTGTCGTGATGAAGTGGACTGGAAAAATAAGACCGTTAAGGTTGT  
 CGAAAAATATTCTGATCAGAACAAGCCGTACAAAGAAGGT

SEC ID N°: 22 Secuencia de aminoácidos de LukH MRSA252

ANKDSQDQTKKEHVDKAQQKEKRNVDKDKNTPGPDDIGKNGKVTKRTVSEYDKETNILQNLQDFID  
 DPTYDKNVLLVKKQGSIHSLKFEHRNETNASWLKYPSEYHVDFVQVRNPKTEILDQLPKNKISTAKV  
 DSTFSYSLGGKFDSTKIGIRTSSNSYSKSISYNQNYDTIASGKNNNRHVHWSVVANDLKYGNEIKNRN  
 DEFLFYRNRTRLSTVENPELSFASKYRYPALVRSGFNPEFLTYISNEKSNEKTRFEVYTRNQDILKNKPGI  
 HYGQPILEQNKDQGRFIVVYEVVDWKNKTVKVVVEKYSQNKPYKEG

SEC ID N°: 23 Secuencia de aminoácidos de LukG MRSA252

GCAAGCTCGTATGCGGAAATCAAAGCAAGATCACACCCTCTCAGAAAAGAACCTGGATGGCGA  
 CACCAAGATGTACACCCGTACCGCGACCACGAGCGATACGGAAAAGAAAATTAGCCAGTCTCTGCA  
 ATTTAATTTCTGACCGAACCGAACTACGACAAAGAAACGGTGTATTTAAAGCCAAGGGCACCATC  
 GGCAGCGGTCTGAAAATTCTGAATCCGAACGGCTACTGGAACAGCACCCCTGCGTTGGCCGGGTAG  
 TTATTCCGTTTCAATTCAGAACGTGATGACAACAATAACTCAACCAATGTCACGGATTTTGCACCG  
 AAAAACAAGACGAATCGCGTGAAGTGAATATACCTACGGCTATAAGACGGGGCGGTGATTTGAGT  
 ATCAATCGCGGGCGGTCTGACCGGTAACATCACGAAGGAAAAGAACTACTCGGAAACCATCAGCTAC  
 CAGCAACCGTCTTATCGTACCCTGATTGATCAGCCGACCACGAATAAAGGCGTCGCGTGAAGGT  
 GGAAGCCCATAGCATCAATAACATGGGTGATGATCACACCCGTCAACTGACGAACGACTCTGATGA  
 CCGCGTAAAATCTGAAATTTTTAGTCTGACCCGCAATGGCAACCTGTGGGCAAAAAGATAATTTTAC  
 GCCGAAAAACAAGATGCCGGTACCCTTTCCGAAGGCTTTAATCCGGAATTTCTGGCTGTTATGTC  
 CCATGATAAAAACGACAAAGGTAAGTACGTTTTATCGTCCACTATAAACGCTCGATGGATGACTTT  
 AAAGTGGATTGGAATAAGCATGGCTTCTGGGGTACTGGAGTGGTAAAACCACGTTGACCAGAAA  
 GAAGAAAAGCTGTCCGCCCTGTATGAAGTGGATTGGAAAACGCACGACGTTAACTGATTAAGACC  
 ATCAACGATAAAGAACAGAAG

SEC ID N°: 24 Secuencia de aminoácidos de LukG MRSA252

ASSYAEIKSKITTVSEKNLDGDTKMYTRTATTSDETEKISQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLKI  
 LNPNGYWNSTLRWPGSYSVSIQNVDDNNNSTNVDFAPKNQDESREVKYTYGYKTGGDFSINRGGLT  
 GNITKEKNYSETISYQQPSYRTLIDQPTTNKGVAVKVEAHSINNMGHDHTRQLTNDSDDRVKSEIFSLTR  
 NGNLWAKDNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKNDKKGKSRFIVHYKRSMDDFKLDWNKHGFWG  
 YWSENGHVDQKEEKLALYEVDWKTHTDVKLIKINDKEQK



Fig. 9 (continuación)

SEC ID N°: 25 Secuencia de nucleótidos de LukH MSHR

GACTCACAGGACCCAAAACAAAAGGAACACGTTGATAAGGCACAGCAGAAAGACAAGCAAGATAGC  
 ACCAAGAAAGGCCAAAACGTTGCGGCCCGGATGACGTGCGCAAAAACGGCAAGGTGACCAAACG  
 TACGGAAAGCGAATACGATGAAAAGACCAACATCCTGCAGAACCTGGAATTTAATTTTCATCGATGAC  
 CCGACCTACGATAAAGACGTCTGCTGGTGA AAAAGCAAGGCAGTATTCATTCCAACCTGAAGTTC  
 GAAAGTCACAAGAAGAAAAGAAGCAGCACCTGGCTGAAATATCCGTCAGAATACCATGTTGATTTCC  
 AGGTCAAGCGTAACCCGAAAACCGAAATTCTGGACCAACTGCCGAAAATAAGATCAGTACGGCAA  
 AAGTGGATTCAACCTTTTCGTATACGCTGGGCGGTAATTGACTCCATTAAGGCATCGGTGCGCA  
 ATAGCTCTAACAGCTATTCTCAGACCATTTCTGATAATCAGCAAAACTACGATACGATCGCGAGCGG  
 CAAAACAATAACTGGCATGTGCACTGGTCTGTTATTGCCAACGATCTGAAGTATGGCGGTGAAGT  
 TAAAAATCGTAACGACGAATTTCTGTTCTACCGTAACACCCGCACGAGTTCCGTTGATAATCCGGAA  
 TCATCGTTTGCAGCTAAATATCGTTACCCGGCACTGGTCCGCAGTGGTTTTAATCCGGAATTTCTGA  
 CCTATCTGAGCAACGAAAAGTCTAATGAAAAACGCAGTTTGAAGTGACCTATACGCGTAACCAAGA  
 TATCCTGAAAAATAGCCCGGGCCTGCATTACGCTCCGCCGATTCTGGAAAAGAACAAGGTTGGTCA  
 CCGCTTTATCGTACCTATGAAGTGGATTGGAAAATAAGACGGTGAAGGTGGTTGACAAATACTCT  
 GATGACCAGCCGTTCCGCGAAGGT

SEC ID N°: 26 Secuencia de aminoácidos de LukH MSHR

DSQDQNKKEHVDKAQQKDKQDSTKKGKNVAAPDDVGKNGKVTKRTESEYDEKTNILQNLEFNFIDDP  
 YDKDVLVKKQGSIHNSLKFESHKEEKNSTWLKYPSEYHVDFQVKRNPKTEILDQLPKNKISTAKVDSTF  
 SYTLGGKFDSIKGIGRNSNSYSQTISYNQONDYDTIASGKNNNWHVHWSVIANDLKYGGVEKVRNDFL  
 FYRNRTRSSVDNPESSFAAKYRYPALVRSFNPEFLTYLSNEKSNEKTQFEVYTRNQDILKNSPGLHY  
 APPILEKNKVGHRFIVTYEVDWKNKTVKVVDKYSDDQPFREG

SEC ID N°: 27 Secuencia de nucleótidos de LukG MSHR

AAAATCAAATCGGAAATCACGCAAGTTAGCGAACAGAATATCGACGGCAATACGAAGATGTTTACC  
 CGCACGGCAACGACCTCGGATAGCCAGAAAAGATCAGCCAGTCTCTGCAATTTAACTTCTCTGACC  
 GAATCGAACTACGACAAGGAAACGGTGTTTCATCAAGGCAAAGGGCACCATCGGCTCTGGTCTGAA  
 AATTCTGGACCCGAACGGCTACTGGAATAGTACCCTGCCTGGCCGGTAGTTATTCCGTGTCAAT  
 CCAGAACGTTGATAACAATACCAATACGAAGGTTACGGATTTTGCCTCGAAAACCAAGACGAAAC  
 CCGCGAAGTCAAGTATACCTACGGCTATAAAACGGGCGGTGATTTCTCGATTAGCCCGGGCGGTAT  
 TACCGGTAACATCACGAAAGAAGTAATTATTCTGAAACCATCAGTTACCAGCAACCGAGTTATCGC  
 ACCCTGATTGACCAGCCGGCGACGAATAAGGGCGTTGGTTGGAAAGTCGAAGCCCATCTGATCAA  
 CAATATGGGCCATGATCACACCCGTCAACTGACGAACGATTCCGACAATCGCGTGGGCTCAGAAAT  
 TTTTACCCTGACGCGTAACGGTAATCTGTGGGCGAAAGATAACTTCACGCCGAAAATAAGATGCC  
 GGTACCCGTGTCCGAAGGCTTTAACCCGGAATTTCTGGCCGTTATGTGCGATGATAAAAAGGACAA  
 AGGCAAGAGCAAATTTGTGGTTCACTATAAACGTACGATGGATGACTTTAAATCGATTGGATGCGC  
 CATGGCTTCTGGGGTACTGGACCGGTA AAAATCACGTTGACCAGAAGGAAGAAAACACTGTCTGCA  
 CTGTATGAAGTCGATTGGAAAACCCACGACGTGAAGTTCATTAAGCTCTGGATGACAAAGAAAAG  
 AAA

SEC ID N°: 28 Secuencia de aminoácidos de LukG MSHR

KIKSEITQVSEQNIDGNTKMFTRTATSDSQKKISQSLQFNFLTEPNYDKETVFIKAKGTIGSGLKILDPNG  
 YWNSTLRWPGSYSVSIQNVNNTNTKVTFDFAPKNQDETREVKYTYGYKTGGDFSI SPGGITGNITKERN  
 YSETISYQQPSYRLLIDQPATNKGVGWVKEAHLINMGMHDHTRQLTNDSDNRVGSSEIFLTRNGNLWAK  
 DNFTPKNKMPVTVSEGFNPEFLAVMSHDKKDKGKSKFVVHYKRTMDDFKIDWMRHGFWGYWTGKNH  
 VDQKEEKLSALYEVDWKTHDVKFIKALDDKEKK