

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 979**

21 Número de solicitud: 201530508

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 39/085 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

C12R 1/445 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

15.04.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.10.2016

Fecha de concesión:

18.07.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

25.07.2017

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN PROFESOR NOVOA SANTOS
(68.0%)**

**Hospital Materno Infantil Teresa Herrera. Xubias
de Arriba, 84**

15006 A Coruña (A Coruña) ES y

**SERVICIO GALEGO DE SAÚDE (SERGAS)
(32.0%)**

72 Inventor/es:

BOU ARÉVALO, Germán ;

MOSCOSO NAYA, Mirian;

GARCÍA FERNÁNDEZ, Patricia ;

POVOA CABRAL, Maria Clara y

RODRÍGUEZ LOMBARDEIRO, Silvia

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **VACUNAS VIVAS ATENUADAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

57 Resumen:

La presente invención proporciona cepas bacterianas de *S. aureus* auxótrofas para D-alanina, útiles como vacunas en mamíferos, suficientemente avirulentas (atenuadas) como para evitar efectos patológicos inaceptables, sin sustancialmente ninguna probabilidad de revertir a una cepa de tipo salvaje virulenta y capaces de inducir un nivel suficiente de inmunidad en el huésped como para inducir una protección aceptable frente a una infección por *S. aureus* en un mamífero.

ES 2 586 979 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

DESCRIPCIÓN

VACUNAS VIVAS ATENUADAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

CAMPO DE LA INVENCION

Se proporcionan vacunas de bacterias vivas atenuadas de *Staphylococcus aureus*. También se proporcionan los métodos por los que tales vacunas se pueden obtener.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es un agente patogénico ubicuo que se considera parte de la microbiota normal del ser humano, de hecho se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas de la piel disminuyen puede causar enfermedad. El principal grupo de riesgo son pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. A día de hoy, cerca de 2 mil millones de personas en el mundo han sido colonizadas por este microorganismo.

Los seres humanos son un reservorio natural de *S. aureus*. Entre el 30 y el 50% de los adultos sanos están colonizados, y entre el 10 y el 20% se mantienen colonizados persistentemente. Dicha colonización acontece de forma selectiva en los orificios nasales o narinas (20-40%, en adultos), pliegues intertriginosos, perineo, axilas y vagina. La colonización por *S. aureus* ocurre con tasas más elevadas en:

1. Personas con diabetes tipo 1;
2. usuarios de drogas intravenosas;
3. pacientes con hemodiálisis;
4. pacientes quirúrgicos; y en
5. personas con SIDA.

Los estafilococos se diseminan, normalmente, por la realización de actividades domésticas y comunitarias comunes tales como hacer la cama, vestirse o desvestirse y por determinados grupos humanos que constituyen verdaderos vectores biológicos. En este sentido, el personal sanitario resulta uno de los principales vectores biológicos de diseminación de este tipo de bacteria. Los manipuladores de alimentos también favorecen la diseminación de *S. aureus* enterotoxigénicos, contribuyendo al desarrollo de intoxicaciones alimentarias.

Desde 1970 se ha detectado un incremento paulatino en la incidencia de infecciones nosocomiales por *S. aureus*. Así, durante el periodo de 1990 a 1992, *S. aureus* fue considerado uno de los principales agentes etiológicos de neumonía adquirida en hospitales.

Hoy en día se ha detectado un incremento considerable, probablemente debido a la presión antibiótica, de cepas de *S. aureus* con resistencia a diferentes fármacos antimicrobianos. Entre ellos el estafilococo resistente a meticilina y el estafilococo resistente a vancomicina. Por esta razón existe la necesidad de incrementar el arsenal profiláctico y/o terapéutico existente frente a esta bacteria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona cepas bacterianas de *S. aureus* auxotrófas para D-alanina, útiles como vacunas en sujetos humanos, suficientemente avirulentas (atenuadas) como para evitar efectos patológicos inaceptables, sin sustancialmente ninguna probabilidad de revertir a una cepa de tipo salvaje virulenta y capaces de inducir un nivel suficiente de inmunidad en el huésped como para inducir una protección aceptable frente a una infección por *S. aureus* en un sujeto humano.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la producción de cepas vivas atenuadas de *Staphylococcus aureus* que comprende las siguientes etapas:

- a. Proporcionar una cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* capaz de expresar alanina racemasa y D-aminoácido transaminasa, e
- b. Inactivar al menos uno de los genes que codifican las enzimas alanina racemasas y los genes que codifican para la D-aminoácido transaminasa, de tal manera que dicha inactivación resulte en que dicha cepa bacteriana sea auxotrófa para D- alanina.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el método comprende la inactivación del gen *alr1* que codifica la enzima alanina racemasa 1 y del gen *dat* que codifica la D-aminoácido transaminasa, de tal manera que la cepa bacteriana ya no sea capaz de expresar la alanina racemasa Alr1 funcional y la D-aminoácido transaminasa funcional Dat.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el método comprende la inactivación de los genes *alr1* y *alr2* que codifican las enzimas alanina racemasas y el gen *dat* que codifica la D-aminoácido transaminasa, de tal manera que la cepa bacteriana ya no sea capaz de expresar la alanina racemasa Alr1 funcional, la alanina racemasa Alr2 funcional y la D-aminoácido transaminasa funcional Dat.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus* obtenida u obtenible mediante el método del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas.

5 Un tercer aspecto de la invención se refiere a una cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus*, caracterizada porque dicha cepa comprende inactivados uno o más genes que codifican la enzima alanina racemasa y los genes que codifican la D-aminoácido transaminasa, de tal manera que la cepa bacteriana ya no sea capaz de expresar una alanina racemasa funcional y una D-aminoácido transaminasa funcional, y en el que la
10 inactivación de dichos genes resulte en que dicha cepa bacteriana sea auxotrófa para D-alanina.

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, dicha cepa se caracteriza por la inactivación de los loci *alr1* y *dat*, preferiblemente de los loci *alr1*, *alr2* y *dat*.

15 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende la cepa bacteriana tal y como se ha definido ésta en el segundo o tercer aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas. Preferiblemente, dicha composición es una composición farmacéutica que opcionalmente comprende vehículos farmacéuticamente
20 aceptables así como excipientes y/o otros principios activos, más preferiblemente dicha composición es una vacuna que opcionalmente comprende vehículos farmacéuticamente aceptables así como excipientes, adyuvantes y/o otros principios activos. Los adyuvantes, excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son portadores conocidos por los expertos en la técnica. Las composiciones
25 proporcionadas por esta invención se pueden facilitar a través de cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma de dosificación adecuada y con los excipientes que son farmacológicamente aceptables para la vía de administración elegida.

30 Un quinto aspecto de la invención se refiere a la composición del cuarto aspecto de la invención, para su uso en terapia.

Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de la cepa bacteriana tal y como se ha definido ésta en el segundo o tercer aspecto de la invención o en cualquiera de sus
35 realizaciones preferidas, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento profiláctico frente a una infección por *Staphylococcus aureus* en un mamífero.

Alternativamente, el sexto aspecto de la invención se refiere a la cepa bacteriana tal y como se ha definido ésta en el segundo o tercer aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas, para su uso en el tratamiento profiláctico frente a una infección por *Staphylococcus aureus* en un mamífero, preferiblemente en un humano.

5

Un séptimo aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo seleccionado del grupo que consiste en F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, "r IgG" y Fc, obtenido u obtenible tras la inmunización de un mamífero con la bacteria viva atenuada auxótrofa para D-alanina tal y como se ha definido ésta en el segundo o tercer aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas.

10

Un octavo aspecto de la presente invención se refiere al uso de los anticuerpos o fragmentos de los mismos del séptimo aspecto de la invención, para la elaboración de un medicamento para su uso en una terapia de inmunización pasiva frente a *Staphylococcus aureus* en un mamífero, preferiblemente en un sujeto humano. Alternativamente, el octavo aspecto de la invención se refiere a los anticuerpos o fragmentos de los mismos del séptimo aspecto de la invención, para su uso en una terapia de inmunización pasiva frente a *Staphylococcus aureus* en un mamífero, preferiblemente en un sujeto humano.

15

Un noveno aspecto de la presente invención se refiere al uso de los anticuerpos o fragmentos de los mismos del séptimo aspecto de la invención, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento terapéutico (tras la manifestación clínica de la infección) de una infección de *Staphylococcus aureus* en un mamífero, preferiblemente en un sujeto humano. Alternativamente, el noveno aspecto de la invención se refiere a los anticuerpos o fragmentos de los mismos del séptimo aspecto de la invención, para su uso en el tratamiento terapéutico (tras la manifestación clínica de la infección) de una infección de *Staphylococcus aureus* en un mamífero, preferiblemente en un sujeto humano.

20

25

Un décimo aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para la producción de una composición farmacéutica, preferiblemente una vacuna, que comprenda cepas vivas atenuadas de *Staphylococcus aureus*, que comprende las siguientes etapas:

30

- a. Proporcionar una cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* capaz de expresar alanina racemasa y D-aminoácido transaminasa;
- b. Inactivar al menos uno de los genes que codifican las enzimas alanina racemasa y los genes que codifican para la D-aminoácido transaminasa, de

35

tal manera que dicha inactivación resulte en que dicha cepa bacteriana sea auxótrofa para D- alanina; y

- 5 c. Generar una composición farmacéuticamente aceptable, preferiblemente una vacuna, que comprenda dicha bacteria viva atenuada donde dicha composición preferiblemente comprende un vehículo y excipientes farmacéuticamente aceptables así como adyuvantes en el supuesto que dicha composición sea una vacuna.

10 En una realización preferida del décimo aspecto de la invención, el método comprende la inactivación del gen *alr1* que codifica la enzima alanina racemasa y del gen *dat* que codifica la D-aminoácido transaminasa, de tal manera que la cepa bacteriana ya no sea capaz de expresar la alanina racemasa Alr1 funcional y la D-aminoácido transaminasa funcional Dat.

15 En otra realización preferida del décimo aspecto de la invención, el método comprende la inactivación de los genes *alr1* y *alr2* que codifican las enzimas alanina racemasas y el gen *dat* que codifica la D-aminoácido transaminasa, de tal manera que la cepa bacteriana ya no sea capaz de expresar la alanina racemasa Alr1 funcional, la alanina racemasa Alr2 funcional y la D-aminoácido transaminasa funcional Dat.

20 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La figura 1 muestra de forma esquemática la estructura general de la pared bacteriana de las bacterias Gram-positivas (ácidos teicoicos y lipoteicoicos no representados). PG, peptidoglicano. M, membrana plasmática.

25 La figura 2 muestra de forma esquemática las rutas metabólicas implicadas en la formación de la D-alanina. Los genes *alr1*, *alr2* y *dat* codifican las proteínas Alr1, Alr2 y Dat, respectivamente.

30 La figura 3 muestra el alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las alaninas racemasas de *Staphylococcus aureus* 132 (ALR1_STAPH132 y ALR2_STAPH132), *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25618 (ALR_MYCTU), *Streptococcus pneumoniae* serotipo 4 (ALR_STRPN), *Listeria monocytogenes* serotipo 4b (ALR_LISMC) y *Bacillus subtilis* 168 (ALR1_BACSU y ALR2_BACSU) utilizando el programa Clustal Omega (1.2.1).

35 Los aminoácidos conservados en todas las alaninas racemasas se muestran sombreados

en negro y los aminoácidos con propiedades fisicoquímicas similares se indican con fondo gris.

La figura 4 muestra el cribado de las colonias resultantes del segundo evento de recombinación durante la construcción del triple mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ de *S. aureus* 132. Las colonias individuales fueron seleccionadas desde agar TSB con 5 mM de D-alanina e inoculadas en la misma posición en placas de agar TSB con y sin 5 mM D-alanina y en presencia o no de eritromicina (Ery, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y X-Gal (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las colonias con el genotipo $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ son sensibles a eritromicina y crecen exclusivamente en placas con D-alanina.

La figura 5 muestra el crecimiento de los mutantes Δdat , $\Delta dat/\Delta alr1$, $\Delta dat/\Delta alr2$ y $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ de *S. aureus* 132 en medio líquido TSB en presencia (panel A) o no (panel B) de 5 mM de D-alanina, tras 24 h de incubación a 37°C con agitación. Las cepas doble $\Delta dat/\Delta alr1$ y triple $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ mutante muestran un crecimiento normal en TSB suplementado con 5 mM de D-alanina, pero no se observa ningún crecimiento visible en ausencia de este compuesto. Sin embargo, las cepas *S. aureus* 132 salvaje y el doble mutante $\Delta dat/\Delta alr2$ crecen normalmente en presencia o ausencia de D-alanina.

La figura 6 muestra la confirmación por PCR de las deleciones génicas en los mutantes Δdat , $\Delta dat/\Delta alr1$, $\Delta dat/\Delta alr2$ y $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ de *S. aureus* 132 (cepa salvaje). A. Los oligonucleótidos alr1EXT-F y alr1EXT-R se utilizaron para originar fragmentos alr1-EXT con 1600 pb a partir de las cepas portadoras del locus salvaje *alr1* o un fragmento de 451 pb a partir de cepas portadoras del locus mutante $\Delta alr1$. Los oligonucleótidos alr1-F y alr1-R se utilizaron para generar un fragmento interno del gen *alr1* (alr1-INT) con 491 pb solo a partir de las cepas portadoras del locus salvaje *alr1*. B. Los oligonucleótidos alr2EXT-F y alr2EXT-R se utilizaron para originar fragmentos alr2-EXT con 1521 pb a partir de las cepas portadoras del locus salvaje *alr2* o un fragmento de 469 pb a partir de cepas portadoras del locus mutante $\Delta alr2$. Los oligonucleótidos alr2-F y alr2-R se utilizaron para generar un fragmento interno del gen *alr2* (alr2-INT) con 519 pb solo a partir de las cepas portadoras del locus salvaje *alr2*. C. Los oligonucleótidos datEXT-F y datEXT-R se utilizaron para originar fragmentos dat-EXT con 1892 pb a partir de las cepas portadoras del locus salvaje *dat* o un fragmento de 1049 pb a partir de cepas portadoras del locus mutante Δdat . D. Los oligonucleótidos dat-F y dat-R se utilizaron para generar un fragmento interno del gen *dat* (dat-INT) con 540 pb solo a partir de las cepas portadoras del locus salvaje *dat*. M, patrón de pesos moleculares.

La figura 7 muestra los ensayos de crecimiento y viabilidad de las cepas *S. aureus* 132 salvaje y triple mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$. La cepa mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ presenta un crecimiento normal en medio de cultivo TSB suplementado con 5 mM de D-alanina, pero no es capaz de crecer sin el aporte exógeno de este compuesto. Sin embargo, la cepa salvaje crece de forma normal en medio TSB con y sin la adición de D-alanina. A. Turbidez del cultivo. B. Viabilidad del cultivo.

La figura 8 muestra la determinación de la concentración mínima de D-alanina necesaria para el crecimiento del mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ de *S. aureus* 132 sobre medio TSB agar. Cultivos de la cepa salvaje y el triple mutante crecidos en medio TSB suplementado con 10 mM de D-alanina hasta una OD_{600nm} de 0,2 se sembraron (100 μ L) en TSB agar sin D-alanina (0 mM) o con D-alanina a concentraciones desde 0,005 mM hasta 10 mM como se indica en la figura. A. Cepa salvaje *S. aureus* 132. B. Triple mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ de *S. aureus* 132.

La figura 9 muestra alteraciones a nivel morfológico en el triple mutante *S. aureus* 132 $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ (panel B) con respecto a su homólogo salvaje (panel A) en presencia de diferentes concentraciones de D-alanina. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio electrónico de barrido a dos escalas diferentes (5 o 20 μ m).

La figura 10 muestra diferentes morfologías atípicas, degeneración progresiva de la pared celular y la lisis de la cepa mutante *S. aureus* 132 $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ cuando se mantiene en ausencia de D-alanina. Como control se muestra la cepa salvaje con su pared celular intacta. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio electrónico de transmisión a escalas diferentes según lo especificado por barras horizontales. Las flechas negras indican las células bacterianas intactas con morfología normal; las flechas discontinuas indican células fragmentadas y sin pared celular bacteriana, las células lisadas y el material genético disperso.

La figura 11 muestra la evaluación de la estabilidad del fenotipo auxótrofo en la cepa de *S. aureus* 132 $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$. En la gráfica se representa el número de colonias de la cepa mutante recuperadas en TSB agar (símbolos abiertos) y TSB suplementado con 5 mM de D-alanina (símbolos cerrados) a lo largo del tiempo, cuando esta cepa se cultivó en medio líquido TSB suplementado con 5 mM de D-alanina a 37°C con agitación (210 rpm) durante 11 días. A. UFC/mL. B. Log UFC/mL. * $P < 0.0001$, según la prueba t de Student.

La figura 12 muestra el porcentaje de supervivencia de ratones BALB/c infectados por vía intraperitoneal con *S. aureus* 132 de tipo salvaje (A) y la cepa triple mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ (B), llevada a cabo en un modelo de sepsis aguda para determinar las dosis letales (DL). A. DL₁₀₀ para la cepa salvaje igual a 5X, siendo 1X aproximadamente igual a 1×10^7 UFC. B. DL₁₀₀ para la cepa mutante igual a 250X en comparación con la cepa de tipo salvaje. La supervivencia se controló durante 14 días.

La figura 13 muestra el Log₁₀ de los títulos a punto final de anticuerpos IgG producidos frente a la cepa isogénica Δspa de *S. aureus* 132 en ratones BALB/c (n=5) al día 14 (una toma) y 21 (dos tomas) post-vacunación con diferentes dosis de la cepa mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ de *S. aureus* 132, y en los ratones control, no vacunados. Dosis de vacunación: (A) 1×10^6 UFC, (B) $1,5 \times 10^7$ UFC, (C) 5×10^7 UFC. Los títulos de anticuerpos fueron determinados por un ELISA indirecto. Valor P, según la prueba U de Mann-Whitney. *P<0,05 y **P<0,005 comparado con el grupo de ratones sin inmunizar.

La figura 14 muestra el porcentaje de pérdida de peso a lo largo del tiempo (panel A) y la carga bacteriana en el bazo e hígado de ratones BALB/c (n=5) (panel B) a las 43 horas tras la infección con un inóculo de 2×10^7 UFC de la cepa de tipo salvaje *S. aureus* 132. Los ratones fueron pre-inmunizados a los días 0 y 14 con la cepa mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ (suministrando una dosis de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ CFU), o no vacunados (grupo control administrados con suero salino los mismos días). Valor P de acuerdo con la prueba U de Mann-Whitney. En el panel B cada punto representa la carga bacteriana individual del bazo o hígado de un ratón. El valor medio de cada grupo está representado por una línea horizontal.

La figura 15 muestra el porcentaje de la supervivencia de ratones BALB/c (n=5) tras la infección intraperitoneal con una dosis de 2×10^7 UFC de la cepa de tipo salvaje *S. aureus* 132. Los ratones vacunados se inmunizaron en los días 0 y 14 con la cepa de *S. aureus* $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ (dosis de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ UFC) y se desafiaron el día 21 con la cepa salvaje. En los ratones no vacunados se administró una solución salina igualmente a los días 0 y 14, y se infectaron con la cepa salvaje el día 21. **P=0,0046 supervivencia del grupo de ratones vacunados en comparación con el grupo no vacunados. Valor P, según la prueba de Mantel-Cox (*Log-rank test*). La supervivencia de los ratones se siguió durante 15 días.

La figura 16 muestra el porcentaje de supervivencia de ratones BALB/c (n=6) tras ser desafiados con una dosis de aproximada de 6×10^7 UFC de la cepa de tipo salvaje *S. aureus* 132. Los ratones fueron inmunizados pasivamente con suero de ratones vacunados con la cepa *S. aureus* $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ o bien con suero de ratones no inmunizados, en el grupo control. *P=0,0008 supervivencia de los ratones inmunizados pasivamente con el suero de ratones vacunados en comparación con la de ratones no inmunizados. Valor P, según la prueba de Mantel-Cox (*Log-rank test*). La supervivencia de los ratones se siguió durante 7 días.

La figura 17 muestra la reactividad cruzada (Log_{10}) de los anticuerpos IgG producidos por los ratones BALB/c (n=6) al 7º día después de la segunda toma de la vacuna (dosis aproximada de $1,5 \times 10^7$ CFU) y en ratones control (no vacunados) frente a 2 cepas de *S. aureus* de diferente origen: USA300LAC (origen humano) y RF122 (origen bovino). Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante un ELISA indirecto. *P=0.0179 y P=0.0357, respectivamente, en comparación con el grupo de ratones no inmunizados. Valor P de acuerdo con la prueba U de Mann-Whitney.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

DEFINICIONES

En el contexto de la presente invención el término “D-alanina” se entiende como el compuesto o molécula con fórmula molecular $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$, peso molecular 89,09 (g/mol) y que se presenta en la forma de D-enantiómero de la alanina. Su nombre sistemático es “D-alanina”, pero también puede designarse (sin limitarse a) “D-Ala”, “338-69-2” “(R)-Alanina”, “ácido D-2-amino propanoico”, “(2R)-2-aminopropanoico”, “forma D-alfa de la alanina”, “ácido (R)-2-amino propanoico” y H-D-Ala-OH. Su nomenclatura en el sistema IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) es ácido (2R)-2-amino propanoico y su identificador en la base de datos “PubChem Compound” es el 71080.

En el contexto de la presente invención el término “alanina racemasa” se entiende como la proteína que cataliza la reacción de interconversión de L-alanina a D-alanina, necesaria para la síntesis de la pared bacteriana. Su identificador EC (*Enzyme Commission number*) es el 5.1.1.1. Esta proteína se identifica fácilmente y de forma invariable en las bases de datos de secuencias nucleotídicas o aminoacídicas por su código EC, que se refiere a una enzima cuya actividad catalítica es L-alanina = D-alanina, ya que su designación puede ser variable.

En el contexto de la presente invención el término “D-aminoácido transaminasa” se entiende como la proteína que cataliza la reacción de interconversión de D-alanina y 2-oxoglutarato a piruvato y D-glutamato. Su identificador EC (*Enzyme Commission number*) es el 2.6.1.21. Esta proteína se identifica fácilmente y de forma invariable en las bases de datos de secuencias nucleotídicas u aminoacídicas por su código EC, que se refiere a una enzima cuya actividad catalítica es D-alanina + 2-oxoglutarato = piruvato + D-glutamato, ya que su designación puede ser variable.

En el contexto de la presente invención el término “auxótrofa para D-alanina” se entiende como la carencia de una ruta metabólica funcional que genere la sustancia D-alanina, de la que depende para su crecimiento la bacteria así denominada, debido a la incapacidad de sintetizar este compuesto.

En el contexto de la presente invención el término “Alr1” se entiende como sinónimo del término “alanina racemasa 1”.

15

En el contexto de la presente invención el término “Alr2” se entiende como sinónimo del término “alanina racemasa 2”.

En el contexto de la presente invención el término “Dat” se entiende como sinónimo del término “D-aminoácido transaminasa”.

20

En el contexto de la presente invención el término “*alr1*” se entiende como un gen o secuencia de nucleótidos que codifica una proteína alanina racemasa. Dependiendo de la cepa de *Staphylococcus aureus*, los genes cromosómicos codificantes de la proteína alanina racemasa se pueden denominar (sin limitarse a) *alr1* o *alr*, o estar identificados únicamente por su locus cromosómico.

25

En el contexto de la presente invención el término “*alr2*” se entiende como un gen o secuencia de nucleótidos que codifica una proteína alanina racemasa. Dependiendo de la cepa de *Staphylococcus aureus*, los genes cromosómicos codificantes de la proteína alanina racemasa se pueden denominar (sin limitarse a) *alr2* o *dal*, o estar identificados únicamente por su locus cromosómico.

30

En el contexto de la presente invención el término “*dat*” se entiende como un gen o secuencia de nucleótidos que codifica una proteína alanina racemasa. Dependiendo de la

35

cepa de *Staphylococcus aureus*, los genes cromosómicos codificantes de la proteína D-aminoácido transaminasa se pueden denominar (sin limitarse a) *dat*, o estar identificados únicamente por su locus cromosómico.

5 En el contexto de la presente invención el término “inactivación” se entiende como el bloqueo de la expresión de un gen concreto o de una proteína, bien sea través de la modificación molecular o regulación negativa de uno o ambos. La modificación molecular incluye el uso de las técnicas convencionales de DNA recombinante que a su vez incluyen: la sustitución de uno o varios nucleótidos, la inserción de uno o varios nucleótidos, la
 10 deleción parcial o total de un gen, la interrupción por mutagénesis inducida químicamente o inducida por radiación. La regulación negativa de la expresión de un gen o proteína incluye el silenciamiento génico transcripcional y postranscripcional.

En el contexto de la presente invención, el término “*Staphylococcus aureus*” se define como
 15 cualquier microorganismo que pertenece al dominio “Bacteria”, filo “Firmicutes”, clase “Bacilli”, orden “Bacillales”, familia “Staphylococcaceae”, género “*Staphylococcus*” y especie “*S. aureus*”. Los microorganismos así definidos se caracterizan por ser cocos Gram-positivos anaerobios facultativos.

20 En el contexto de la presente invención, el término “ $\Delta alr1$ ” se define como la ausencia del locus *alr1* en el cromosoma de la cepa *S. aureus* 132.

En el contexto de la presente invención, el término “ $\Delta alr2$ ” se define como la ausencia del
 locus *alr2* en el cromosoma de la cepa *S. aureus* 132.

25 En el contexto de la presente invención, el término “ Δdat ” se define como la ausencia del locus *dat* en el cromosoma de la cepa *S. aureus* 132.

En el contexto de la presente invención, el término “doble mutación $\Delta alr1/\Delta alr2$ ” se define
 30 como la ausencia simultánea de los locus *alr1* y *alr2* en el cromosoma de la cepa *S. aureus* 132.

En el contexto de la presente invención, el término “doble mutación $\Delta dat/\Delta alr1$ ” se define
 como la ausencia simultánea de los locus *dat* y *alr1* en el cromosoma de la cepa *S. aureus*
 35 132.

En el contexto de la presente invención, el término “doble mutación $\Delta dat/\Delta alr2$ ” se define como la ausencia simultánea de los locus *dat* y *alr2* en el cromosoma de la cepa *S. aureus* 132.

- 5 En el contexto de la presente invención, el término “triple mutación $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ ” se define como la ausencia simultánea de los locus *dat*, *alr1* y *alr2* en el cromosoma de la cepa *S. aureus* 132.

10 En el contexto de la presente invención el término “132” se refiere a cualquier cepa bacteriana con la misma designación y que pertenece al dominio “Bacteria”, filo “Firmicutes”, clase “Bacilli”, orden “Bacillales”, familia “Staphylococcaceae”, género “*Staphylococcus*” y especie “*S. aureus*”. Esta es una cepa clínica resistente a la meticilina (Vergara-Irigaray y col., *Infection and Immunity*, 2009, 77:3978-3991), y se utilizó en esta invención como un modelo para generar un mutante auxótrofo de *Staphylococcus aureus*.

15 En el contexto de la presente invención, el término “132 Δspa ” se refiere a un microorganismo con la misma designación y la pertenencia al dominio “Bacterias”, phylum “Firmicutes”, clase “bacilos”, orden “Bacillales”, familia “Staphylococcaceae”, género “*Staphylococcus*” y especie “*S. aureus*”. El microorganismo así definido es una cepa de *S.*
20 *aureus* 132 con el gen *spa* deletado (Vergara-Irigaray y col., *Infection and Immunity*, 2009, 77:3978-3991).

En el contexto de la presente invención el término “USA300LAC” se refiere a cualquier cepa bacteriana con la misma designación y que pertenece al dominio “Bacteria”, filo “Firmicutes”,
25 clase “Bacilli”, orden “Bacillales”, familia “Staphylococcaceae”, género “*Staphylococcus*” y especie “*S. aureus*”. El microorganismo así definido es una cepa epidémica resistente a meticilina de *S. aureus* causante de infecciones en la comunidad (descrita en Diep y col., *Lancet*, 2006, 367:731-739).

30 En el contexto de la presente invención el término “RF122” se refiere a cualquier cepa bacteriana con la misma designación con la secuencia tipo MLST 151 (ST151) y complejo clonal 151 (CC151) y que pertenece al dominio “Bacteria”, filo “Firmicutes”, clase “Bacilli”, orden “Bacillales”, familia “Staphylococcaceae”, género “*Staphylococcus*” y especie “*S. aureus*”. El microorganismo así definido es una cepa de *S. aureus* aislada de vaca que
35 presentaba signos clínicos de mastitis (descrita en Herron-Olson L y col., 2007, *PLoS One* 2:e1120).

En el contexto de la presente invención el término “ED133” se refiere a cualquier cepa bacteriana con la misma designación con la secuencia tipo MLST 133 (ST133) y complejo clonal 133 (CC133) y que pertenece al dominio “Bacteria”, filo “Firmicutes”, clase “Bacilli”, orden “Bacillales”, familia “Staphylococcaceae”, género “*Staphylococcus*” y especie “*S. aureus*”. El microorganismo así definido es una cepa de *S. aureus* causante de mastitis en oveja y recuperada en Francia (descrita en Guinane y col., 2010, Genome Biol Evol 2:454-466).

En el contexto de la presente invención el término “ED98” se refiere a cualquier cepa bacteriana con la misma designación con la secuencia tipo MLST 5 (ST5) y complejo clonal 5 (CC5) y que pertenece al dominio “Bacteria”, filo “Firmicutes”, clase “Bacilli”, orden “Bacillales”, familia “Staphylococcaceae”, género “*Staphylococcus*” e especie “*S. aureus*”. El microorganismo así definido es una cepa de *S. aureus* adaptada a aves de corral y recuperada de un pollo enfermo (descrita en Lowder y col., 2009, PNAS 106:19545-19550).

En el contexto de la presente invención el término “DC10B” se refiere a cualquier cepa bacteriana con la misma designación y que pertenece al dominio “Bacteria”, filo “Proteobacteria”, clase “Gammaproteobacteria”, orden “Enterobacteriales”, familia “Enterobacteriaceae”, género “*Escherichia*” y especie “*E. coli*”. El microorganismo así definido es una cepa de *E. coli* DH10B con una delección del gen *dcm* y es un huésped idóneo para la construcción de plásmidos recombinantes que posteriormente se van a introducir directamente en *S. aureus* por electroporación (descrita en Monk y col., 2012, mBio 3(2):e00277-11).

En el contexto de la presente invención, el término “cepas bacterianas auxotrófas para D-alanina” se entiende como cualquier cepa bacteriana incapaz de producir una forma funcional y/o activa de la enzima alanina racemasa y la enzima D-aminoácido transaminasa. Esta deficiencia puede ser debida al: bloqueo de la expresión de sus genes codificantes, modificaciones postranscripcionales y modificaciones postraduccionales que afecten tanto a la actividad enzimática, a la regulación alostérica o a la localización celular de estas enzimas.

En el contexto de la presente invención el término “inmunización pasiva” se usa para referirse a la administración de anticuerpos o fragmentos de los mismos, a un individuo con la intención de conferir inmunidad a ese individuo.

En el contexto de la presente invención, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de anticuerpos de la invención o de cepas bacterianas atenuadas de la invención que permitan producir el efecto deseado. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los portadores conocidos por los expertos en la técnica. Las composiciones proporcionadas por esta invención se pueden facilitar por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada y con los excipientes farmacológicamente aceptables para la vía de administración elegida.

En el contexto de la presente invención, el término "vacuna" se refiere a una preparación antigénica empleada para establecer la respuesta del sistema inmune a una enfermedad. Adicionalmente este término incluye las denominadas vacunas terapéuticas que tienen como objeto tratar la enfermedad una vez se hayan manifestados los primeros síntomas clínicos de la misma.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las vacunas vivas atenuadas se basan en microorganismos a los que previamente se les ha limitado su capacidad patogénica, pero que conservan su capacidad de inducir una respuesta inmune celular y/o humoral imitando una infección natural, pero sin causar la enfermedad. Una vez que se ha vacunado al animal o al ser humano, la entrada del patógeno microbiano en el huésped induce rápidamente a una "rellamada" de la inmunidad anterior que puede controlar el crecimiento adicional del microorganismo antes de que la infección asuma proporciones clínicamente significativas. En este tipo de vacunas, dependiendo del nivel de atenuación, existe el peligro de que el huésped pueda contraer la enfermedad, aunque se genere una respuesta inmune protectora. Por ello, es necesario garantizar la estabilidad genética de la cepa atenuada eliminando cualquier posibilidad de que esta cepa revierta a la cepa silvestre virulenta. Además, resulta crucial que la vacuna provoque un nivel suficiente de inmunidad (protección) en el huésped.

Las cepas bacterianas auxótrofas para D-alanina (D-Ala) han perdido su capacidad para producir D-alanina, componente necesario para la síntesis del peptidoglicano de la pared bacteriana y sustituyente en los ácidos teicoicos de pared y lipoteicoicos asociados a membrana. Como ya se ha comentado, para su uso como vacunas estas cepas deben estar suficientemente atenuadas, pero también han de ser capaces de generar una respuesta inmune efectiva e inducir una protección duradera en el huésped. Esto último no es sencillo. De hecho, la solicitud de patente internacional WO 99/25376 describe una cepa atenuada de

Listeria monocytogenes auxótrofa para D-alanina, que además contiene DNA codificante de un antígeno heterólogo (un antígeno HIV-1) y el método para su uso como vacuna. Los ejemplos experimentales que se proporcionan en esta solicitud de patente simplemente establecen que los mutantes atenuados de *L. monocytogenes* auxótrofos para D-alanina inducen una respuesta inmune celular, pero no consideran una respuesta inmune mediada por anticuerpos (inmunidad humoral) que sea capaz de conferir protección cruzada y por tanto, de generar una respuesta inmune amplia para patógenos mayoritariamente extracelulares, como *Staphylococcus aureus*, y productores de toxinas. Además, el posible efecto protector del mutante de *L. monocytogenes* auxótrofa para D-Ala, se determinó a partir del recuento de bacterias en el bazo de ratones pre-inmunizados que posteriormente fueron infectados con la cepa silvestre de *Listeria*. Sin embargo, no se realizaron ensayos de supervivencia, que serían claves para poder medir la eficacia protectora de la vacuna frente a infecciones bacterianas agudas y letales. Asimismo, los autores reconocen que el mutante auxótrofo de *Listeria* proporciona una baja protección cuando se administra en ausencia de D-alanina, o lo que es lo mismo, deben suplementar con D-alanina el inóculo inicial del mutante para poder alcanzar el mismo nivel de protección que la cepa silvestre, con lo cual reducen la dosis letal del mutante, limitando seriamente la seguridad de la vacuna.

Además, la dosis de la cepa atenuada de *Listeria monocytogenes* auxótrofa para de D-alanina necesaria para conseguir un nivel de protección aceptable (2×10^7 CFU), y determinada mediante recuento de la carga bacteriana presente en bazo, es muy cercana a la DL_{50} cuando se inyecta en presencia de D-Ala (7×10^7 CFU), lo cual limita seriamente su uso como vacuna. Un nivel de protección equiparable ya se consigue inoculando la cepa parental en una dosis 100 veces inferior a la DL_{50} (1×10^4 CFU). La administración de una dosis 100 veces inferior (2×10^5 CFU), que estaría dentro unos límites de seguridad aceptables, reduce al 50% la eficacia de la vacuna en términos de protección (Thompson y col., Infect Immun, 1998, 66:3552-3561). Todos estos datos ponen de relieve que la suplementación de D-alanina en el inóculo de la cepa atenuada condiciona seriamente que la administración de la vacuna sea segura y aumentaría el riesgo de efectos patológicos indeseables en el huésped.

En contra, los datos recogidos en la presente solicitud de patente, muestran que la cepa *Staphylococcus aureus* auxótrofa para D-alanina está altamente atenuada en un modelo murino de infección sistémica, presentando una dosis letal 100 (DL_{100} ; dosis mínima necesaria para reducir la supervivencia de los ratones al 0%) significativamente más alta que la DL_{100} que presenta la cepa silvestre y además, es capaz de proporcionar un nivel

significativo de protección en los ratones frente a la muerte en ensayos de supervivencia sin que exista la necesidad de añadir un suplemento de D-alanina en el inóculo inicial. Igualmente, se demostró que este candidato vacunal es capaz de inducir significativamente una respuesta inmune mediada por anticuerpos en ratones inmunizados con dos tomas de la vacuna y que dichos anticuerpos son capaces de reconocer cepas heterólogas de *S. aureus*, o lo que es lo mismo, se pone de manifiesto que la vacuna tiene la capacidad de generar una respuesta inmune amplia en el huésped. Estos anticuerpos pueden, a su vez, usarse para inmunizar pasivamente a los ratones, conferiéndoles una protección frente a la muerte por una enfermedad letal aguda causada por *S. aureus*, como también se recoge en la presente solicitud de patente. Por ejemplo, la inmunización pasiva con anticuerpos dirigidos contra la toxina tetánica, es un tratamiento que podría salvar la vida del paciente en una infección aguda por *Clostridium tetani* (también una bacteria gram-positiva). Además, se ha demostrado que la cepa bacteriana auxótrofa para D-Ala no tiene sustancialmente ninguna probabilidad de revertir a la cepa silvestre virulenta.

15

Asimismo, los autores de la presente invención han demostrado que la pre-inmunización de los ratones con un mutante auxótrofo para D-alanina de la especie *S. aureus* produce una reducción significativa en la carga bacteriana en bazo e hígado de los ratones infectados con una dosis letal de *S. aureus*.

20

La inmunidad humoral (mediada por anticuerpos) es la principal respuesta específica protectora contra las bacterias extracelulares, como *S. aureus*. Los polisacáridos de las paredes celulares y de las cápsulas de estos microorganismos (tanto Gram-positivos como Gram-negativos) constituyen unos de los componentes más inmunogénicos de las mismas y son el prototipo de antígeno T independiente. Dichos antígenos estimulan a las células B que generan una respuesta de inmunoglobulina (Ig) M y G específica contra los antígenos de superficie (polisacáridicos o proteicos) y las toxinas bacterianas, que estimulan los mecanismos efectores para favorecer su fagocitosis por vía celular (monocitos, macrófagos y neutrófilos). Por otra parte, las Ig producidas neutralizan las toxinas bacterianas impidiendo que se unan a sus células blanco, promoviendo su fagocitosis. Algunas toxinas bacterianas (superantígenos) pueden también estimular inespecíficamente a las células T, y en consecuencia se liberan grandes cantidades de citoquinas y mediadores inflamatorios que finalizan con la producción del síndrome del shock tóxico. La toxina del síndrome del shock tóxico de *S. aureus* (TSST) es un ejemplo de estos superantígenos.

35

A su vez, las bacterias intracelulares como *Mycobacterium* y *Listeria monocytogenes*, son capaces de sobrevivir y replicar dentro de células del huésped y aún dentro de fagocitos, y como están en un nicho inaccesible a los anticuerpos circulantes, su eliminación requiere mecanismos inmunes distintos a los ya vistos para las bacterias extracelulares.

5

Por lo tanto, resulta claro que el tipo de respuesta inmune generado por una vacuna – que puede ser mediado por células o anticuerpos u ambos, puede afectar el nivel de protección frente a un determinado microorganismo, si éste se trata de un patógeno extracelular o intracelular. No se puede prever así que una vacuna compuesta por una cepa de *Listeria*
10 *monocytogenes* auxótrofa para D-alanina pueda generar una respuesta que proteja frente a una infección de origen extracelular.

Otra de las diferencias significativas entre *S. aureus* y *Listeria monocytogenes* que puede afectar al tipo de respuesta inmune es la constitución de su pared.

15

La pared celular bacteriana es una estructura altamente organizada y compleja que permite a las bacterias interactuar con el medio que les rodea, les da su forma característica y les proporciona protección mecánica. El peptidoglicano, que constituye la estructura básica de la pared celular de las eubacterias, es un copolímero formado por una secuencia alterna de
20 N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico unidos mediante enlaces β -1,4. La capa de peptidoglicano es sustancialmente más gruesa en las bacterias Gram-positivas (20 a 80 nm) que en las bacterias Gram-negativas (7-8 nm) y constituye alrededor del 90% del peso seco de las bacterias Gram-positivas frente al 10% en bacterias Gram-negativas. Además del peptidoglicano, la pared celular de bacterias Gram-positivas se encuentra compuesta de
25 ácidos teicoicos, que están presentes en pequeñas cantidades y embebidos en la pared de la bacteria como polisacáridos ácidos. El término de ácidos teicoicos se refiere a los polímeros de la pared que contienen unidades de glicerolfosfato o de ribitolfosfato. Estos polialcoholes están unidos por ésteres fosfato y a menudo presentan unidos otros azúcares y D-alanina. Algunos de estos ácidos que contienen glicerol están unidos a lípidos de la
30 membrana de las bacterias Gram-positivas y debido a esta íntima asociación con lípidos, estos ácidos teicoicos se denominan también ácidos lipoteicoicos.

Como se ilustra en la figura 1, la D-alanina es uno de los principales componentes de la pared celular de peptidoglicano y por lo tanto la D-alanina es necesaria para la síntesis de la
35 pared celular. Dos tipos de enzimas catalizan la formación de D-alanina (véase la figura 2):

1. La alanina racemasa, Alr (EC 5.1.1.1), una enzima que cataliza la racemización reversible entre enantiómeros de alanina (L-alanina y D-alanina); y
2. D-aminoácido transaminasa, Dat (EC 2.6.1.21), una enzima que cataliza la reacción reversible de transaminación entre el piruvato y el D-glutamato para dar D-alanina y 2-oxoglutarato.

5

La D-alanina, una vez sintetizada, se incorpora inicialmente en la cadena peptídica unida a los residuos del ácido N-acetilmurámico del peptidoglicano como dipéptido D-alanil-D-alanina.

- 10 En el peptidoglicano de la pared celular de *S. aureus* se encuentra una L-lisina en la tercera posición de la cadena peptídica que está unida el ácido N-acetilmurámico, y existe un puente de entrecruzamiento de pentaglicinas entre la D-alanina y la L-lisina de las cadenas peptídicas de dos capas glicánicas adyacentes. En *Listeria* existe un residuo de diaminopimérico en lugar de la L-lisina y no están presentes las 5 glicinas que sirven de
- 15 puente de entrecruzamiento entre las cadenas glicánicas adyacentes. Adicionalmente, *S. aureus* presenta dos tipos de ácidos teicoicos (TAs): ácidos teicoicos de pared (WTAs) y ácidos lipoteicoicos (LTAs) que contienen residuos de D-alanina como sustituyentes. En *Listeria*, estos sustituyentes de ésteres de D-alanina sólo se han descrito en los LTAs. Los WTAs asociados al peptidoglicano son altamente variables en su estructura y a menudo son
- 20 característicos de especie e incluso existen variaciones específicas de cepa. En general, los LTAs asociados a membrana presentan menos diversidad estructural y en su composición que los WTAs.

Por tanto, en *S. aureus* la D-alanina no solo participa en los entrecruzamientos del

25 peptidoglicano sino que también forma parte de los WTA y LTA. Inicialmente los residuos de D-alanina se incorporan a los LTAs y desde aquí se van transfiriendo a los WTAs de *S. aureus*; por tanto, la composición de la pared entre ambos patógenos es diferente. La presencia de estos ésteres de D-alanina en los TAs parecen tener algún papel en la regulación de actividad autolítica, unión del Mg^{2+} en la pared celular, susceptibilidad de la

30 bacteria a nisina, defensinas, etc, muerte por fagocitos, formación de biofilmes, adherencia a células epiteliales, etc. En *S. aureus* los TAs esterificados con D-alanina protegen contra péptidos antimicrobianos catiónicos producidos por el huésped.

Por lo tanto, no es posible concluir a raíz de los datos sobre *L. monocytogenes* expuestos

35 arriba, que las cepas bacterianas auxótrofas para D-alanina de *S. aureus* sean

suficientemente avirulentas (atenuadas) para evitar efectos patológicos inaceptables, y que a su vez puedan inducir un nivel suficiente de inmunidad en el huésped sin presentar sustancialmente ninguna probabilidad de revertir a una cepa de tipo salvaje virulenta.

- 5 Por lo tanto, una realización de la invención se refiere a bacterias atenuadas vivas de la especie *S. aureus* adecuadas como candidatos de vacunas que ya no son capaces de producir D-alanina.

10 Las bacterias atenuadas vivas para su uso de acuerdo con la invención como candidatos de vacunas se pueden obtener de varias maneras, algunas de estas maneras quedan claramente evidenciadas en el ejemplo 2 de la presente invención titulado “*Construcción y caracterización de cepas mutantes simples, dobles y triples de S. aureus sin alanina racemasa y/o D-aminoácido transaminasa*”.

15 En consecuencia, un primer aspecto de la invención se refiere a una nueva tecnología de plataforma para el diseño y la producción de vacunas basadas en cepas bacterianas vivas atenuadas auxótrofas para D-alanina pertenecientes a la especie *S. aureus*. Esta nueva tecnología de plataforma tiene potencial en una amplia variedad de cepas bacterianas pertenecientes a dicha especie.

20 Por lo tanto, una forma de realización del primer aspecto de las presentes invenciones se refiere a un método *in vitro* para la producción de cepas vivas atenuadas de *Staphylococcus aureus* que comprende las siguientes etapas:

- 25 a. Proporcionar una cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* capaz de expresar alanina racemasa y D-aminoácido transaminasa, e
- b. Inactivar al menos uno de los genes que codifican las enzimas alanina racemasa y los genes que codifican para la D-aminoácido transaminasa, de tal manera que dicha inactivación resulte en que dicha cepa bacteriana sea auxótrofa para D-
- 30 alanina.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el método comprende la inactivación del gen *alr1* que codifica la enzima alanina racemasa y del gen *dat* que codifica la D-aminoácido transaminasa, de tal manera que la cepa bacteriana ya no sea capaz de

35 expresar la alanina racemasa Alr1 funcional y la D-aminoácido transaminasa funcional Dat.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el método comprende la inactivación de los genes *alr1* y *alr2* que codifican las enzimas alanina racemasas y el gen *dat* que codifica la D-aminoácido transaminasa, de tal manera que la cepa bacteriana ya no sea capaz de expresar la alanina racemasa Alr1 funcional, la alanina racemasa Alr2 funcional y la D-aminoácido transaminasa funcional Dat.

Tal inactivación puede ser una inserción, una delección, una sustitución o una combinación de los mismos, a condición de que la inactivación conduzca a la ausencia de expresión de al menos una alanina racemasa y una D-aminoácido transaminasa funcionales. Una alanina racemasa y/o una D-aminoácido transaminasa funcionales se entienden como proteínas que tienen las características de regulación de las proteínas de tipo salvaje. Por lo tanto, una alanina racemasa y/o una D-aminoácido transaminasa que son defectuosas son por lo tanto incapaces de participar en la síntesis de D-alanina y se consideran proteínas no funcionales.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus* obtenida u obtenible mediante el método del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a una cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus*, caracterizada porque dicha cepa comprende inactivados uno o más genes que codifican la enzima alanina racemasa y los genes que codifican la D-aminoácido transaminasa, de tal manera que la cepa bacteriana ya no sea capaz de expresar una alanina racemasa funcional y una D-aminoácido transaminasa funcional, y en el que la inactivación de dichos genes resulte en que dicha cepa bacteriana sea auxótrofa para D-alanina.

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, dicha cepa se caracteriza por la inactivación de los loci *alr1* y *dat*, preferiblemente de los loci *alr1*, *alr2* y *dat*.

Tal inactivación puede ser una inserción, una delección, una sustitución o una combinación de los mismos, a condición de que la inactivación conduzca a la ausencia de expresión de al menos una alanina racemasa y una D-aminoácido transaminasa funcionales. Una alanina racemasa y/o una D-aminoácido transaminasa funcionales se entienden como proteínas que tienen las características de regulación de las proteínas de tipo salvaje. Por lo tanto, una alanina racemasa y/o una D-aminoácido transaminasa que son defectuosas son por lo tanto incapaces de participar en la síntesis de D-alanina y se consideran proteínas no funcionales.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende la cepa bacteriana tal y como se ha definido ésta en el segundo o tercer aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas.

5 Además y como ya se ha dicho en todo el texto, debido a su carácter atenuado pero inmunogénico *in vivo*, las cepas bacterianas, como se define en cualquiera de los aspectos segundos o terceros en cualquiera de sus formas de realización preferibles, son muy adecuadas como base para vacunas vivas atenuadas. En consecuencia, preferiblemente, dicha composición es una composición farmacéutica que opcionalmente comprende
10 vehículos farmacéuticamente aceptables así como excipientes y/o otros principios activos.

Además, y en relación con el uso como vacuna de las cepas bacterianas de la invención mencionada en el párrafo precedente, la presente invención se refiere, además, como un quinto aspecto de la invención, a dichas composiciones, en particular, a composiciones de
15 vacunas vivas atenuadas que comprenden las cepas bacterianas mutantes auxótrofas como se define en cualquiera de los segundos o terceros aspectos de la invención o en cualquiera de sus formas de realización preferibles.

Estas composiciones son especialmente adecuadas para la protección de los animales y los seres humanos contra la infección con la forma de tipo salvaje de la cepa bacteriana mutante auxótrofa. Tales animales pueden ser seleccionados del grupo que consiste de
20 placentarios (incluyendo seres humanos), marsupiales y monotremas. Tales composiciones farmacéuticas, en composiciones de vacuna en particular, comprenden una cantidad inmunogénicamente efectiva de la bacteria viva atenuada como se define en cualquiera de
25 los segundos o terceros aspectos de la invención o en cualquiera de sus correspondientes formas de realización preferibles.

Además de una cantidad inmunogénicamente efectiva de la bacteria viva atenuada descrita anteriormente, una composición farmacéutica, en particular, una vacuna, de acuerdo con la
30 presente invención también contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal vehículo puede ser tan simple como agua, pero puede, por ejemplo, también comprender medio de cultivo en el que las bacterias se cultivaron. Otro vehículo adecuado es, por ejemplo, una solución de concentración salina fisiológica.

35 La dosificación útil a administrar variará dependiendo de la edad, el peso del animal vacunado y del modo de administración.

La composición farmacéutica, en particular la vacuna, puede comprender cualquier dosis de bacterias, suficientes para provocar una respuesta inmune. Las dosis que oscilan entre 10^3 y 10^{10} bacterias son, por ejemplo, dosis muy adecuadas.

5 Opcionalmente, se pueden añadir uno o más compuestos que tienen actividad adyuvante para la vacuna. Los adyuvantes son estimuladores no específicos del sistema inmune. Mejoran la respuesta inmune del huésped a la vacuna. Los ejemplos de adyuvantes conocidos en la técnica son de Freund completo e incompleto de adyuvante, vitamina E, polímeros de bloque no iónicos, muramildipéptidos, ISCOM (complejos estimulantes
 10 inmunes, cf. por ejemplo la patente europea EP 109.942), saponina, aceite mineral, aceite vegetal y Carbopol. Los adyuvantes, especialmente adecuados para la aplicación en la mucosa son, por ejemplo, la toxina *E. coli* lábil al calor (LT) o toxina del cólera (CT). Otros adyuvantes adecuados son por ejemplo hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio u óxido de aluminio, emulsiones oleosas (por ejemplo de Bayol F® o Marcol 52®), saponinas o
 15 solubilizado de vitamina E.

Por lo tanto, en forma preferible, las vacunas de acuerdo con la presente invención comprenden un adyuvante.

20 Otros ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables útiles en la presente invención incluyen estabilizantes tales como SPGA, hidratos de carbono (por ejemplo, sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrano), proteínas tales como albúmina o caseína, agentes que contienen proteínas tales como suero bovino o leche desnatada y tampones (por ejemplo tampón fosfato). Especialmente cuando se añaden tales
 25 estabilizantes a la vacuna, la vacuna es muy adecuada para secado por congelación. Por lo tanto, en forma preferible, la vacuna está en una forma liofilizada.

Para la administración a animales o seres humanos, la vacuna de acuerdo con la presente invención puede darse de forma intranasal, intradérmica, subcutánea, oral, por aerosol o por
 30 vía intramuscular. Para aplicación a aves de corral, la membrana del ala y administración de gotas para ojos son muy adecuados. El medicamento, composición farmacéutica o vacuna de la invención se pueden usar tanto en pacientes asintomáticos como en los que ya han mostrado síntomas de la enfermedad.

35 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo seleccionado del grupo que consta en fragmentos "Fab", "F(ab')₂ , fragmentos "Fv",

fragmentos Fv de cadena única o "scFv", "diacuerpos" y "anticuerpos biespecíficos" (Bab), (en lo sucesivo, a partir del anticuerpo o fragmento del mismo de la invención) o que puede obtenerse después de la inmunización de un mamífero con la bacteria viva atenuada auxótrofa para D-alanina que se define en cualquiera de los segundo o terceros aspectos de la invención o en cualquiera de sus formas de realización preferidas correspondientes.

En una forma de realización preferible de este aspecto de la invención, el mamífero utilizado para la inmunización se selecciona del grupo que consiste de placentarios (incluyendo seres humanos), marsupiales y monotremas.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere a los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención para su uso en terapia, en particular para uso en la inmunización pasiva.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica, en particular, una composición de vacuna, que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención.

En una forma de realización preferible de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende además un adyuvante y/o un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Como en el caso anterior, para la administración a animales o seres humanos del anticuerpo o fragmento del mismo de la invención, la composición farmacéutica, en particular la vacuna, puede darse, entre otras formas, via intranasal, intradérmica, subcutánea, oral, por aerosol o por vía intramuscular. Para aplicación a aves de corral, la membrana del ala y administración de gotas para ojos son muy adecuados. El medicamento, composición farmacéutica o vacuna se puede usar tanto en pacientes asintomáticos como en los que ya han mostrado síntomas de la enfermedad.

El propósito de los siguientes ejemplos es simplemente para ilustrar la invención y no sirven para limitar la misma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Análisis e identificación de los nucleótidos y de las secuencias de aminoácidos de los genes que codifican la enzima alanina racemasa de *S. aureus* 132

35

Los autores de la presente invención llevaron a cabo una búsqueda de genes que codifican las enzimas alanina racemasa y D-aminoácido transaminasa en genomas completos de *S. aureus* utilizando la Base de datos de proteínas (UniProtKB) y la Herramienta de búsqueda de base de datos. Dos secuencias de aminoácidos correspondientes a las proteínas Alr1 y Alr2 fueron identificadas. Estas secuencias se compararon entre sí, y con otras secuencias de proteínas alanina racemasas presentes en otras especies bacterianas, por medio de la herramienta de alineación de Clustal Omega.

Como resultado del análisis anterior se encontraron en el genoma de *S. aureus* 132 dos genes candidatos para posibles alanina racemasas: el gen que denominamos *alr1* que codifica una proteína de 382 aminoácidos llamada Alr1 y el gen *alr2* que codifica una proteína de 361 aminoácidos llamada Alr2. Igualmente se identificó el gen *dat* que codifica una D-aminoácido transaminasa, Dat de 282 aminoácidos.

La Figura 3 muestra el alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las alaninas racemasas de *S. aureus* 132 (ALR1_STAPH132 y ALR2_STAPH132) y las alaninas racemasas de *M. tuberculosis* ATCC 25618 (ALR_MYCTU), *S. pneumoniae* serotipo 4 (ALR_STRPN), *Listeria monocytogenes* serotipo 4b (ALR_LISMC) y *B. subtilis* 168 (ALR1_BACSU y ALR2_BACSU). Las proteínas Alr1 y Alr2 de *S. aureus* 132 presentan entre sí un 28,5% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Las proteínas Alr1 y Alr2 poseen una identidad de 39,3% y 23,9% con las alanina racemasas Alr1 y Alr2 de *B. subtilis* 168, respectivamente.

Ejemplo 2. Construcción y caracterización de cepas mutantes simples, dobles y triples de *S. aureus* sin alanina racemasas y/o D-aminoácido transaminasa

Con el fin de generar los mutantes de delección, se llevó a cabo una recombinación doble homóloga utilizando el vector pMAD termosensible. En primer lugar, se realizó la supresión de la D-aminoácido transaminasa (Dat) y este mutante llamado Δdat se utilizó como base para generar los mutantes dobles y el triple mutante, independientemente.

Para la construcción de estos mutantes, se amplificaron por PCR y se clonaron por separado en el plásmido pMAD fragmentos de aproximadamente 1000 pb que corresponden a las regiones de ADN situadas delante (upstream) y detrás (downstream) de los genes *dat*, *alr1* y *alr2*. Los plásmidos recombinantes resultantes se utilizan para eliminar los genes

cromosómicos *dat*, *alr1* y *alr2*, respectivamente, localizados en el cromosoma de la cepa *S. aureus* 132 de tipo salvaje.

5 *S. aureus* 132 se utiliza en la presente invención como un organismo modelo de la especie "*Staphylococcus aureus*" para generar mutantes auxotrófos para D-alanina. Esta es una cepa clínica resistentes a la meticilina (MRSA) (Vergara-Irigaray et al., 2009, *Infection and Immunity*, 77: 3978-3991).

10 El fragmento upstream del gen *alr1* se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando la combinación de oligonucleótidos *alr1UP-F*(MluI) y *alr1UP-R*(NotI), y posteriormente fue digerido por las enzimas de restricción MluI y NotI. El fragmento downstream del gen *alr1* se obtuvo mediante amplificación por PCR usando los oligonucleótidos *alr1DN-F*(NotI) y *alr1DN-R*(BglII), seguida por digestión con enzimas NotI y BglII. Los fragmentos upstream y downstream digeridos se clonaron en el vector pMAD previamente linealizado con las
15 enzimas MluI y BglII, generando la construcción llamada pMAD_UP/DOWN_*alr1*.

La misma estrategia se siguió para la construcción de los plásmidos pMAD_UP/DOWN_*alr2* y pMAD_UP/DOWN_*dat*. Los fragmentos upstream y downstream del gen *alr2* fueron amplificados utilizando los pares de oligonucleótidos *alr2UP-F*(MluI) / *alr2UP-R*(NotI) y *alr2b-DN-F* (NotI) / *alr2DN-R*(BglII), respectivamente. De la misma forma, los fragmentos
20 upstream y downstream del gen *dat* fueron amplificados utilizando los pares de oligonucleótidos *datUP*(MluI)F / *datUP*(NotI)R y *datDOWN*(NotI)F / *datDOWN*(BglII)R, respectivamente.

25 Las tres construcciones pMAD_UP/DOWN_*alr1*, pMAD_UP/DOWN_*alr2* y pMAD_UP/DOWN_*dat* se introdujeron en *E. coli* DC10B por electroporación. Las colonias transformantes se seleccionaron en agar LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y X-Gal (150 µg/mL). Después de la incubación a 37°C durante 18 h, las colonias azules resistentes a la ampicilina fueron sometidas a PCR para comprobar la presencia de
30 pMAD_UP/DOWN_*alr1*, pMAD_UP/DOWN_*alr2* o pMAD_UP/DOWN_*dat* con las combinaciones de oligonucleótidos *alr1Ext-F*/*alr1Ext-R*, *alr2Ext-F*/*alr2Ext-R* o *datExtF*/*datExtR*, respectivamente.

35 La construcción pMAD_UP/DOWN_*dat* se extrajo a partir de *E. coli* DC10B y se transformó directamente por electroporación en la cepa específica de *S. aureus* 132. La selección de colonias de *S. aureus* 132 que contenían el plásmido recombinante se realizó en agar TSB

suplementado con eritromicina (10 µg/mL) y X-Gal (150 µg/mL) tras 24-48 h de incubación a 30°C.

Para eliminar el gen cromosómico *dat* de la cepa *S. aureus* 132, una colonia azul de *S. aureus* 132 conteniendo pMAD_UP/DOWN_ *dat* fue inoculada a 3 ml de TSB con 10 µg/mL de eritromicina y cultivada a 30°C durante 2 h. Después, el cultivo se incubó a 43,5°C, una temperatura no permisiva para la replicación del plásmido pMAD, lo que lleva a la integración de pMAD_UP/DOWN_ *dat* en el cromosoma bacteriano por medio de una sola recombinación. Después de 6 horas, se sembraron diluciones seriadas del cultivo sobre placas de agar TSB suplementadas con eritromicina (10 µg/mL) y X-Gal (150 µg/mL) y se incubaron posteriormente a 43,5°C durante 18 h. Varias de las colonias resultantes se transfirieron a 2 ml de TSB sin antibiótico y se incubaron durante 24 h a 30°C con el fin de inducir un segundo evento de recombinación que conduce a la escisión del plásmido pMAD_UP/DOWN_ *dat* a partir del cromosoma. La selección de colonias de color blanco, que ya no contienen pMAD_UP / DOWN_ *dat*, se llevó a cabo mediante siembra de diluciones seriadas en placas de agar TSB con X-Gal (150 µg/mL) y sin antibiótico. Cada colonia blanca seleccionada se inoculó sobre agar TSB suplementado o no con eritromicina (10 µg/mL) y X-Gal (150 µg/mL). Se comprobó la supresión del gen *dat* (Δdat) en las colonias blancas sensibles a eritromicina mediante PCR utilizando los pares de oligonucleótidos *datExtF/datExtR*, *datseqF/datseqR* y *datF/datR*.

Para generar los dobles mutantes $\Delta alr1/\Delta dat$ o $\Delta alr2/\Delta dat$, los plásmidos pMAD_UP/DOWN_ *alr1* o pMAD_UP/DOWN_ *alr2* se introdujeron por electroporación en la cepa mutante *S. aureus* Δdat y se llevó a cabo el mismo protocolo descrito anteriormente. En este caso, la recuperación del doble mutante puede requerir la adición exógena de D-alanina (5 o 10 mM) al medio TSB o agar TSB. La ausencia de los loci *alr1* (o *alr2*) y *dat* en el genoma de *S. aureus* 132 tipo salvaje fue confirmada por PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos: *alr1Ext-F/alr1Ext-R*, *alr1UP-Fseq/alr1DN-Rseq*, *alr1-F/alr1-R* (o *alr2Ext-F/alr2Ext-R*, *alr2UP-Fseq/alr2DN-Rseq*, *alr2-F/alr2-R*), y *datExtF/datExtR*, *datseqF/datseqR* y *datF/datR*.

El triple mutante $\Delta alr1/\Delta alr2/\Delta dat$ se generó introduciendo por electroporación el plásmido pMAD_UP/DOWN_ *alr2* en la cepa mutante *S. aureus* $\Delta dat/\Delta alr1$ y siguiendo el protocolo para el sistema de intercambio alélico descrito anteriormente. También en este caso, la recuperación del triple mutante $\Delta alr1/\Delta alr2/\Delta dat$ requirió la adición exógena de D-alanina (5 o 10 mM) al medio TSB. La figura 4 representa el método de cribado de colonias realizado

para las colonias blancas sensibles a eritromicina seleccionadas como resultado del segundo evento de recombinación para el triple mutante $\Delta alr1/\Delta alr2/\Delta dat$.

El cultivo de los diferentes mutantes en medio con y sin D-alanina reveló que la delección simple del gen *dat* o la delección doble de los genes *dat* y *alr2* no afecta al crecimiento bacteriano. Sin embargo, el doble mutante $\Delta alr1/\Delta dat$ y el triple mutante $\Delta alr1/\Delta alr2/\Delta dat$ requieren la presencia de D-alanina en el medio para su crecimiento (figura 5).

La Figura 6 muestra la confirmación por PCR de las diferentes delecciones en los cuatro mutantes de *S. aureus* 132. Los resultados obtenidos demuestran que la supresión simultánea de los genes *alr1*, *alr2* y *dat* genera en esta cepa una incapacidad para crecer sin la presencia de D-alanina. Asimismo, el doble mutante $\Delta alr1/\Delta dat$ no crece de forma visible en ausencia de D-alanina.

Por lo tanto, vale la pena señalar que la inactivación de las proteínas alanina racemasas y D-aminoácido transaminasa producen una auxotrofia para D-alanina y que el método para la obtención de mutantes auxótrofos que pertenecen a especies de *S. aureus* es independiente de la cepa seleccionada.

20 **Ejemplo 3. Efecto de la D-alanina en el crecimiento y la viabilidad del triple mutante ($\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$)**

Para evaluar la curva de crecimiento y la viabilidad del triple mutante de *S. aureus* 132 $\Delta alr1/\Delta alr2/\Delta dat$ en comparación con el tipo salvaje, ambas cepas se inocularon en fase de crecimiento exponencial (dilución 1:200) en 100 mL de TSB suplementado o no con 5 mM de D-alanina, y se incubaron a 37°C con agitación constante (210 rpm). La densidad óptica de cada cultivo y su concentración bacteriana se determinaron en el momento inicial de la inoculación y después cada hora hasta un total de 8 h de incubación. La densidad óptica se evaluó mediante la medición de alícuotas de cada matraz a DO_{600nm} mientras que la concentración de bacterias (UFC/mL) se calculó mediante la siembra de diluciones 1:10 en placas de agar TSB. Todos los cultivos se realizaron por triplicado.

Las curvas de crecimiento y viabilidad se realizaron para evaluar el efecto de la ausencia de D-alanina en el medio a lo largo del tiempo para las cepas de *S. aureus* 132 salvaje y triple mutante $\Delta alr1/\Delta alr2/\Delta dat$.

La cepa $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ presenta un crecimiento normal en medio de cultivo TSB suplementado con 5 mM de D-alanina, pero no es capaz de crecer sin el aporte exógeno de este compuesto (figura 7A). Sin embargo, la cepa de tipo salvaje crece de forma normal en medio TSB con y sin la adición de D-alanina. Se observó que la viabilidad del triple mutante en medio TSB disminuyó aproximadamente 2 unidades logarítmicas a las 8 h de incubación debido a la limitación de D-alanina en el medio de cultivo (figura 7B).

Ejemplo 4. Determinación de la concentración mínima de D-alanina necesaria para el crecimiento del mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ de *S. aureus* 132 sobre medio TSB agar

10

Para determinar la concentración mínima de D-alanina necesaria para el crecimiento del triple mutante ($\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$) se tomaron muestras de cultivos en fase exponencial de la cepa salvaje *S. aureus* 132 y del triple mutante crecidos en medio TSB suplementado con 10 mM de D-alanina hasta una OD_{600nm} de 0,2. Las bacterias se recogieron por centrifugación y se lavaron con medio TSB, resuspendiéndolas en el volumen original con medio TSB y posteriormente se sembraron (100 μ L) en agar TSB sin D-alanina (0 mM) o con concentraciones crecientes de D-alanina desde 0,005 mM a 10 mM, como se indica en la figura 8. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y se observó el crecimiento bacteriano. La cepa parental de tipo salvaje mostró un crecimiento confluyente en agar TSB sin D-alanina (figura 8A). Con respecto al triple mutante ($\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$) se observó una ausencia de colonias a concentraciones inferiores a 0,05 mM de D-alanina, colonias dispersas a 0,1 mM de D-alanina y un crecimiento confluyente sobre las placas a concentraciones superiores a 0,5 mM de D-alanina.

Ejemplo 5. Análisis morfológico de las cepas *S. aureus* 132 salvaje y triple mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ mediante microscopía electrónica

Para la toma de microfotografías mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), las cepas *S. aureus* 132 salvaje y el triple mutante se cultivaron durante 16 h a 37°C en TSB suplementado con 10 mM D-alanina. Las bacterias se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con NaCl 0,9% y finalmente se resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo TSB. Se inocularon 50 μ L de cada cultivo en 5 mL de TSB suplementado con concentraciones crecientes de D-alanina: 0; 0,01; 0,1; 1 y 10 mM y se incubó a 37°C durante 3 h con agitación constante (180 rpm). Los cultivos bacterianos obtenidos se centrifugaron y los sedimentos se lavaron dos veces con PBS. A continuación, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 0,1 M pH 7,4 durante 30 min a temperatura ambiente y con

35

agitación. Tras la fijación, las muestras se lavaron nuevamente 2 veces con PBS, y se deshidrataron con una serie de concentraciones crecientes de alcohol (50%, 70%, 90%, 100%) durante 15 min cada una. Finalmente, las muestras se secaron en el punto crítico con CO₂ (Bal-Tec CPD 030). Una gota de cada muestra se colocó en una tapa deslizante y fija sobre un soporte de aluminio para el revestimiento de oro (Bal - Tec SCD 004 Sputter). Las muestras se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM - 6400.

A nivel microscópico, se observaron cambios morfológicos y estructurales significativos en la cepa mutante ($\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$) debidos a la disminución progresiva en el aporte exógeno de D-alanina. La figura 9 muestra las microfotografías obtenidas que permiten la comparación visual entre el triple mutante y su homólogo salvaje después de crecer en medio TSB suplementado con concentraciones crecientes de D-alanina. El panel B de la figura 9 muestra que la cepa *S. aureus* $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ no es capaz de dividirse sin adición externa de D-alanina. De acuerdo con ello, las células bacterianas detectadas a 0 mM de D-alanina corresponden en su mayoría al inóculo inicial que se cultiva previamente en la presencia de este compuesto y como posible consecuencia de la división celular incompleta se observaron también células deformadas y protoplastos. En presencia de D-alanina 0,1 mM se observa una densidad bacteriana ligeramente mayor, pero los protoplastos y algunas formas alargadas todavía están presentes. Finalmente, cuando se suplementa el medio con D-alanina 10 mM se puede observar que tanto la densidad como la morfología celular del triple mutante es comparable a la que presentan las células bacterianas esféricas de la cepa de tipo salvaje (panel A), volviéndose indistinguible de éste.

Para la toma de microfotografías mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), la cepa salvaje y el triple mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ se cultivaron en agar TSB suplementado con 10 mM de D-alanina durante 18 h a 37°C. A continuación se subcultivaron en placas de agar Mueller-Hinton y se incubaron a 37°C durante 18 h. Después de la incubación, varias colonias se resuspendieron en tampón PBS. Tras recoger las células por centrifugación, el sedimento resultante se lavó primero con tampón de cacodilato, e inmediatamente después las células se fijaron en glutaraldehído al 2,5% frío preparado en 0,2 M tampón de cacodilato de sodio pH 7,4 durante 4 h a temperatura ambiente. Los sedimentos se lavaron con tampón de cacodilato, se deshidrataron en acetona y fueron embebidos en Spurr (Spurr epoxy medio de inclusión). Se obtuvieron cortes ultrafinos (70 nm) de estas muestras y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo para la observación bajo un microscopio de transmisión de electrones JEOL JEM 1010 (80 kV).

Los estudios de microscopía electrónica de transmisión muestran que la pared celular del triple mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$, cuando se mantiene en ausencia de D-alanina, experimenta una destrucción progresiva como resultado de la inactivación de la alanina racemasa y de la D-aminoácido transaminasa, produciéndose la lisis celular y muerte bacteriana. La Figura 10 muestra diferentes etapas de la degeneración de la pared celular, que van desde la disminución de la capa de mureína y en consecuencia un aumento en el tamaño celular (protoplastos) a células que muestran varias rupturas, la lisis y la extrusión del contenido intracelular (especialmente material genético). Sin embargo, las células bacterianas de la cepa salvaje presentan una morfología normal con la pared celular intacta.

Ejemplo 6. Evaluación de la estabilidad del fenotipo auxótrofo en la cepa de *S. aureus* $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$

Para probar la irreversibilidad de la auxotrofia nutricional de *S. aureus* $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ para el compuesto D-alanina, la cepa triple mutante se cultivó en 100 mL de TSB suplementado con 5 mM de D-alanina en condiciones óptimas durante 11 días a 37°C bajo agitación (180 rpm). Se tomaron muestras de este cultivo al inicio de la incubación y en los días 1, 3, 5, 7 y 11 para la determinación de UFC en agar TSB y agar TSB suplementado con 5 mM de D-alanina. Todos los cultivos se realizaron por triplicado. En el caso hipotético de una reversión del fenotipo, los recuentos bacterianos recuperados a lo largo del tiempo deberían ser similares en placas de agar, independientemente de la presencia o ausencia del compuesto en el medio de cultivo. En contraste, se observaron diferencias significativas entre los recuentos bacterianos obtenidos cuando el cultivo se sembró en placas sobre medio de agar con y sin D-alanina.

Los recuentos bacterianos resultantes fueron significativamente mayores en el primer caso (placas de agar suplementado con D-alanina) en la etapa inicial de la incubación (día 0) y en los días 1, 3, 5, 7 y 11 (véase la figura 11) ($P < 0,0001$, según la prueba t de Student). Aunque significativamente muy inferior, la recuperación de un número bajo de colonias en las placas de agar sin D-alanina puede ser debido a un crecimiento residual derivado de la acumulación de este compuesto en el citoplasma de las células bacterianas durante el crecimiento en medio suplementado. Esta diferencia indica que la cepa $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ permanece auxótrofa para D-alanina a través del tiempo, sin la posibilidad de reversión al fenotipo salvaje.

Ejemplo 7. Determinación de la dosis letal (DL) de *S. aureus* de tipo salvaje 132 y triple mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ en ratones BALB/c en un modelo de infección aguda

Los autores de la presente invención producen una infección sistémica en ratones BALB/c mediante la administración intraperitoneal de un inóculo de la cepa salvaje *S. aureus* 132 y del triple mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ en solución salina con 3% de mucina gástrica porcina. Para la preparación del inóculo, las bacterias se cultivaron en medio TSB (tipo salvaje) o TSB suplementado con 10 mM de D-alanina (triple mutante) a 37°C con agitación (180 rpm) hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.7. Los cultivos se centrifugaron y se lavaron con suero salino, y finalmente se resuspendieron en suero salino con 3% de mucina gástrica. Al inóculo bacteriano correspondiente de aproximadamente 1×10^7 UFC se le denominó 1X. Las suspensiones bacterianas se ajustaron desde el inóculo antes mencionado a diferentes dosis según fue necesario y se inocularon (250 μ l) en ratones BALB/c (n=5) por vía intraperitoneal. La supervivencia de los ratones se controló durante 14 días. Las dosis letales (DL) se determinaron de acuerdo a la supervivencia observada en ambos casos. DL₁₀₀ se define como la dosis letal mínima para conseguir el 100% de mortalidad de los ratones.

La figura 12A muestra diferentes grados de supervivencia en ratones infectados con dosis crecientes de la cepa *S. aureus* 132 de tipo salvaje. Se observó una disminución gradual en la supervivencia de los ratones con respecto a la dosis 1X, determinándose la DL₁₀₀ cuando la dosis administrada es igual o mayor que 5X para la cepa salvaje.

La figura 12B muestra diferentes grados de supervivencia en ratones infectados con dosis crecientes del triple mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$. La DL₁₀₀ que se determinó para esta cepa fue de 250X, una dosis muy alta de inóculo bacteriano, lo que indica que esta cepa es menos virulenta y se encuentra altamente atenuada respecto a su homólogo salvaje. Además, como se ilustra en la figura, con un inóculo de la cepa triple mutante equivalente a la DL₁₀₀ de la cepa parental virulenta ninguno de los ratones sucumbió a la infección, o lo que es lo mismo, se obtuvo una supervivencia del 100%. Por lo tanto, la DL₁₀₀ del triple mutante es 50X superior a la DL₁₀₀ de su homólogo salvaje. Esto demuestra que el triple mutante es una cepa altamente atenuada con respecto a la cepa parental de tipo salvaje.

Ejemplo 8. Cuantificación de los anticuerpos IgG contra *S. aureus* 132 Δspa por ELISA indirecto en sueros de ratones BALB/c sometidos a la vacunación con el triple mutante *S. aureus* $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$

Para evaluar la respuesta inmune a la vacunación mediada por anticuerpos, grupos de ratones BALB/c (n=5) fueron inmunizados los días 0 y 14 mediante inyección intraperitoneal (250 µL) con dosis crecientes del triple mutante $\Delta dat/\Delta air1/\Delta air2$ en solución salina. Dosis de vacunación: (A) 1×10^6 UFC, (B) $1,5 \times 10^7$ UFC, (C) 5×10^7 UFC. En los días 14 y 21 (7 días después de la primera y segunda toma de la vacuna, respectivamente) se obtuvieron muestras de suero de la totalidad de los ratones, junto con muestras de suero de los ratones control, inyectados con solución salina. Para obtener el suero, los ratones fueron anestesiados con sevoflurano y la sangre se les extrajo mediante punción de la vena submandibular. Los sueros se separaron de las células mediante centrifugación y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

La cuantificación de IgG se realizó por medio de un inmunoensayo ligado a enzimas indirecto (ELISA). Se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos con la cepa *S. aureus* 132 Δspa (cepa deficiente en la proteína del gen *spa* de *S. aureus* 132). Por lo tanto, los antígenos-bacterias se fijan a la parte inferior de los pocillos después de 18 h de incubación a 4°C en tampón carbonato-bicarbonato 100 mM, pH 9.6. Se realizaron cinco lavados con solución salina tamponada con tampón fosfato (PBS) para eliminar las bacterias no fijadas. El bloqueo de sitios residuales se realizó en dos pasos para reducir las interacciones no específicas con los sueros de ratón. En primer lugar, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h con 100 µL por pocillo de solución de bloqueo (5% de leche desnatada en PBS) y en segundo lugar, a 37°C durante 1 h con 100 µL de suero de conejo (diluido 1:1000 en PBS). Después de 5 etapas de lavado con tampón de lavado (0,005% de Tween 20 en PBS), las placas se incubaron durante la noche a 4°C con 100 µL de una serie de sueros diluidos en tampón de dilución (medio DMEM con 5-10% de FCS). Al día siguiente, se realizaron 5 lavados con tampón de lavado para eliminar los anticuerpos que no han reaccionado y se añadió 100 µL de anticuerpo secundario por pocillo (IgG anti-ratón marcado con peroxidasa - HRP) diluido 1:5000 en tampón de dilución. La incubación se realizó durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Las placas se lavaron 5 veces con tampón de lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no reaccionan. Para llevar a cabo el proceso de revelado, las placas se incubaron durante 3 min con 100 µL de TMB (sustrato de HRP - peroxidasa). La reacción se detuvo con 50 µL de H_2SO_4 1 M por pocillo. La medida colorimétrica se realizó a 450 nm. Para determinar los títulos de IgG en cada caso, el título a punto final se evaluó como la máxima dilución de suero que tiene un valor que excede la absorbancia del blanco de lectura (absorbancia del tampón de dilución) por 0.1 valores.

Por lo tanto, se utilizaron las muestras de sangre recogidas de cada ratón para determinar el título de anticuerpos (IgG) contra *S. aureus* 132 Δspa por ELISA, y medir así la capacidad de la vacuna para generar una respuesta inmune mediada por anticuerpos. Con las tres dosis ensayadas se detectaron títulos significativos de IgG en los sueros obtenidos siete días tras la segunda toma de la vacuna (día 21) de los ratones inmunizados con respecto a los ratones no vacunados (figura 13), lo cual demuestra la capacidad inmunogénica de esta cepa como vacuna.

Ejemplo 9. Determinación de pérdida de peso corporal y de la carga bacteriana en bazo e hígado en un modelo de infección sistémica con la cepa salvaje *S. aureus* 132 en ratones BALB/c preinmunizados con el triple mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$

Para evaluar la eficacia (nivel de protección) de la cepa $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ como vacuna, ratones BALB/c (n=6) fueron inmunizados vía intraperitoneal (250 μ L) con la cepa $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ en suero salino a la dosis de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ CFU en los días 0 y 14. A un grupo de ratones control (n=6) se les administró 250 μ L de suero salino de forma idéntica a los 0 y 14 días. El día 21, los ratones fueron infectados con un inóculo de la cepa salvaje *S. aureus* 132 (2×10^7 UFC en suero salino con 3% mucina gástrica porcina) por inyección intraperitoneal. En el momento previo al desafío con la cepa salvaje y a las 5, 21, 29 y 43 horas post-desafío, se evaluó el peso corporal de cada ratón de forma individual. A las 43 horas post-infección los ratones fueron sacrificados con tiopental sódico, se extrajeron y pesaron los bazos e hígados asépticamente, y después de ser homogeneizados en suero salino, se determinaron las UFC por gramo de órgano en TSB agar.

Se confirmó así el efecto protector de la vacunación con el triple mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ cuando se observó que la preinmunización con esta cepa protege a los ratones de una disminución de peso corporal abrupta. De hecho en la figura 15A se muestra cómo la pérdida de peso corporal en el grupo de ratones vacunados (aproximadamente un 5% respecto al momento anterior a la infección) es inferior a la experimentada por ratones pertenecientes al grupo salino (10-12%). Igualmente, a partir del recuento de bacterias en el bazo e hígado, los autores de la presente invención demostraron que la administración de la cepa triple mutante $\Delta dat/\Delta alr1/\Delta alr2$ como vacuna provoca una disminución significativa de casi 4 unidades logarítmicas (Log_{10}) ($P=0,0087$ y $P=0,0152$, respectivamente, prueba U de Mann-Whitney) en la carga bacteriana de ratones infectados con una dosis sub-letal de *S. aureus* 132 (figura 15B y 15C).

Ejemplo 10. Protección de los ratones BALB/c contra el desafío con *S. aureus* 132 por inmunización con el mutante $\Delta dat/\Delta a1r1/\Delta a1r2$

Para evaluar la eficacia del mutante $\Delta dat/\Delta a1r1/\Delta a1r2$ de *S. aureus* como vacuna, a los ratones BALB/c (n=5) se le administraron 250 μ l de la cepa $\Delta dat/\Delta a1r1/\Delta a1r2$ (dosis de $1,5 \times 10^7$ UFC en solución salina) en los días 0 y 14. A los ratones control se les administró solo solución salina de forma idéntica en los mismos días. Siete días después de la segunda inyección, los ratones fueron inoculados con la cepa *S. aureus* 132 de tipo salvaje (dosis de 2×10^7 UFC en solución salina con 3% de mucina gástrica porcina) con el fin de establecer una infección sistémica letal en ambos casos. Después de la infección, los ratones fueron monitorizados durante 15 días para determinar la supervivencia de los ratones vacunados en comparación con los ratones control (no vacunados).

Como se muestra en la figura 15 todos los ratones del grupo vacunados sobrevivieron al desafío, superando la infección con una supervivencia del 100%, mientras que todos los ratones en el grupo de no vacunados sucumbieron a la infección en menos de 72 h. Las diferencias en la supervivencia entre los dos grupos fueron estadísticamente significativas ($P < 0.0046$, de acuerdo con la prueba *Log-rank* de Mantel-Cox).

Estos resultados demuestran que la vacunación con la cepa $\Delta dat/\Delta a1r1/\Delta a1r2$ proporciona inmunidad protectora contra la infección aguda por la cepa *S. aureus* 132 .

Ejemplo 11. Protección de los ratones BALB/c mediante la inmunización pasiva con anticuerpos generados con la vacuna $\Delta dat/\Delta a1r1/\Delta a1r2$

En situaciones en las que no existan vacunas autorizadas, o se detecten fallos vacunales en esquemas de inmunización en vigor, el uso de inmunización pasiva con anticuerpos puede ser beneficioso cuando se sospeche de la exposición o contacto con patógenos bacterianos.

A continuación se determinó si el suero de ratones inmunizados con la cepa $\Delta dat/\Delta a1r1/\Delta a1r2$ con un elevado título de anticuerpos de tipo IgG, podría usarse para inmunizar pasivamente ratones no vacunados previamente. Estos sueros se obtuvieron de ratones BALB/c inmunizados (n=5) con tres dosis de aproximadamente 2×10^8 UFC de la cepa triple mutante (administradas en los días 0, 14 y 28). Para obtener el suero (día 35), los ratones fueron anestesiados con tiopental sódico y se extrajo sangre por punción del plexo retro-orbital. Igualmente, se obtuvieron sueros de ratones control (n=5), inyectados con

solución salina. Los sueros fueron separados de las células de la sangre por centrifugación y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Los sueros de ratones inmunizados o sueros de ratones control se administraron por inyección intraperitoneal (250 μL) a ratones BALB/c ($n=6$) 3,5 h antes de la infección con una dosis letal de la cepa *S. aureus* 132 salvaje (6×10^7 UFC) y se monitorizó la supervivencia de los ratones durante 7 días.

Como se muestra en la figura 16, el 85% de los ratones inmunizados pasivamente con suero de ratones vacunados sobrevivieron al desafío, mientras que el 100% de los ratones que recibieron suero control sucumbió a la infección ($P=0.0008$; prueba *Log-rank* de Mantel-Cox).

Estos resultados demuestran que la inmunización pasiva con suero de ratones vacunados con la cepa $\Delta\text{dat}/\Delta\text{alr1}/\Delta\text{alr2}$ es capaz de conferir un nivel significativo de protección contra la infección y que los anticuerpos por sí solos son suficientes para proporcionar inmunidad protectora frente a una infección por sepsis aguda causada por *S. aureus* 132 (inmunidad humoral).

Ejemplo 12. Ensayo de reactividad cruzada con los anticuerpos IgG de ratones BALB/c inmunizados con la cepa $\Delta\text{dat}/\Delta\text{alr1}/\Delta\text{alr2}$ frente cepas heterólogas de *S. aureus*

Con el fin de evaluar si los anticuerpos generados en ratones BALB/c en respuesta al triple mutante $\Delta\text{dat}/\Delta\text{alr1}/\Delta\text{alr2}$ son capaces de reconocer cepas de *S. aureus* no relacionadas se realizó un ELISA indirecto con los sueros indicados en el ejemplo 8 frente a las cepas de *S. aureus* USA300LAC y RF122, y con el pool de sueros administrados pasivamente descrito en el ejemplo 12 frente a las cepas ED133 y ED98. De esta forma, los autores de la presente invención valoran la capacidad de la cepa vacunal para generar una respuesta inmunológica humoral amplia. Cabe resaltar que la cepa *S. aureus* USA300LAC es una cepa MRSA (resistente a meticilina) de gran importancia clínica actual debido a su amplia distribución y por ser causa predominante de infecciones adquiridas en la comunidad en adultos sanos. Por otro lado, las cepas RF122 (origen bovino), ED133 (ovino) y ED98 (aves de corral) constituyen representantes de clones específicamente adaptados a hospedadores animales y causan infecciones en ganado destinado al consumo humano.

Para valorar la reactividad cruzada, se realizó el "tapizado" de placas de forma independiente con las cepas mencionadas y se realizaron los pasos de lavado, detección y revelado tal y como se ha descrito en el ejemplo 8.

Frente a las cepas *S. aureus* USA300LAC y RF122 se obtuvieron resultados similares a los observados frente a la cepa isogénica *S. aureus* 132 Δspa (figura 17). Igualmente, se obtuvieron títulos elevados, ($\text{Log}_{10} 1/\text{título a punto final} = 3,8854$) frente a las cepas ED133 y ED98. En conjunto, se observó una alta capacidad de estos anticuerpos para reconocer determinantes antigénicos de cepas heterólogas de *S. aureus*, lo que demuestra que la inmunización con la cepa $\Delta dat/\Delta air1/\Delta air2$ no solo genera anticuerpos frente a la cepa isogénica salvaje, sino que también genera anticuerpos de tipo IgG que reconocen a otras cepas con diferentes patrones de resistencia y virulencia, e incluso de diferentes orígenes.

10

REIVINDICACION9 G

1. Un método *in vitro* para la producción de cepas vivas atenuadas de *Staphylococcus aureus* que comprende las siguientes etapas:
 - a. Proporcionar una cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* capaz de expresar alanina racemasa y D-aminoácido transaminasa, e
 - b. Inactivar al menos uno de los genes que codifican la enzimas alanina racemasa y los genes que codifican para la D-aminoácido transaminasa, de tal manera que dicha inactivación resulte en que dicha cepa bacteriana sea auxótrofa para D- alanina.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende la inactivación del gen *alr1* que codifica para la enzima alanina racemasa y el gen *dat* que codifica para la D-aminoácido transaminasa, de tal manera que la cepa bacteriana ya no sea capaz de expresar la alanina racemasa Alr1 funcional y la D-aminoácido transaminasa funcional Dat.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende la inactivación de los genes *alr1* y *alr2* que codifican las enzimas alanina racemasas y el gen *dat* que codifica la D-aminoácido transaminasa, de tal manera que la cepa bacteriana ya no sea capaz de expresar la alanina racemasa Alr1 funcional, la alanina racemasa Alr2 funcional y la D-aminoácido transaminasa funcional Dat.
4. Una cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus*, caracterizada porque dicha cepa comprende inactivados uno o más genes que codifican la enzima alanina racemasa y los genes que codifican la D-aminoácido transaminasa, de tal manera que la cepa bacteriana ya no sea capaz de expresar una alanina racemasa funcional y una D-aminoácido transaminasa funcional, y en el que la inactivación de dichos genes resulte en que dicha cepa bacteriana sea auxótrofa para D- alanina.
5. La cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus* de la reivindicación 4, en el que dicha cepa se caracteriza por la inactivación de los loci *alr1* y *dat*.
6. La cepa viva atenuada de *Staphylococcus aureus* de la reivindicación 4, en el que dicha cepa se caracteriza por la inactivación de los loci *alr1*, *alr2* y *dat*.

7. Una composición que comprende la cepa bacteriana tal y como se ha definido ésta en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.

8. Una composición farmacéutica que comprende la cepa bacteriana tal y como se ha definido ésta en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.

5

9. Uso de la cepa bacteriana tal y como se ha definido ésta en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 o cualquiera de las composiciones de las reivindicaciones 7 o 8, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento profiláctico frente a una infección por *Staphylococcus aureus* en un mamífero.

10

10. Uso de la cepa bacteriana tal y como se ha definido ésta en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 o cualquiera de las composiciones de las reivindicaciones 7 o 8, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento profiláctico frente a una infección por *Staphylococcus aureus* en un sujeto humano.

15

11. Un anticuerpo o fragmento del mismo seleccionado del grupo que consiste en F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, "r IgG", Fc, obtenido u obtenible tras la inmunización de un mamífero con la bacteria viva atenuada auxótrofa para D-alanina tal y como se ha definido ésta en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.

20

12. Uso de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la reivindicación 11, para la elaboración de un medicamento para su uso en una terapia de inmunización pasiva frente a *Staphylococcus aureus*.

25

30

35

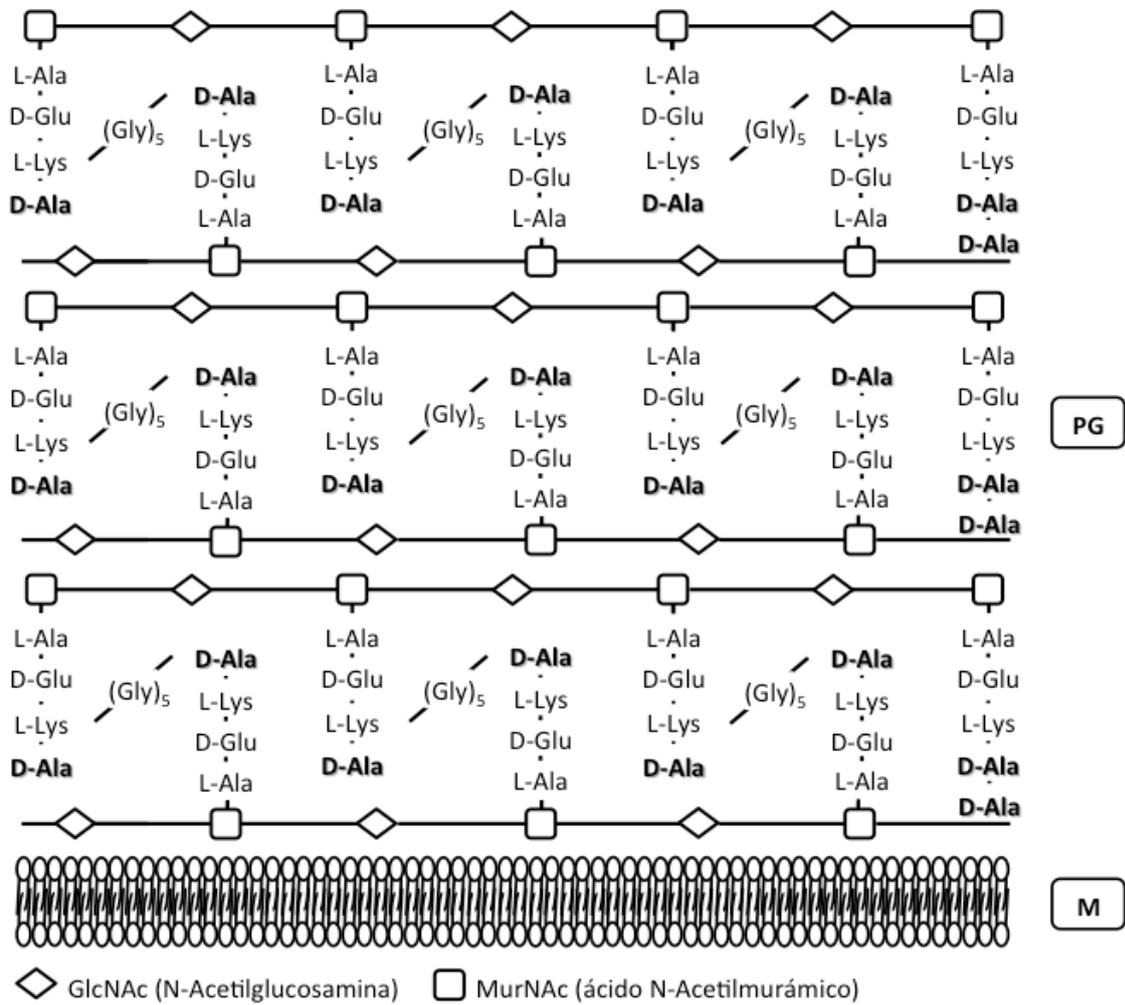


Figura 1

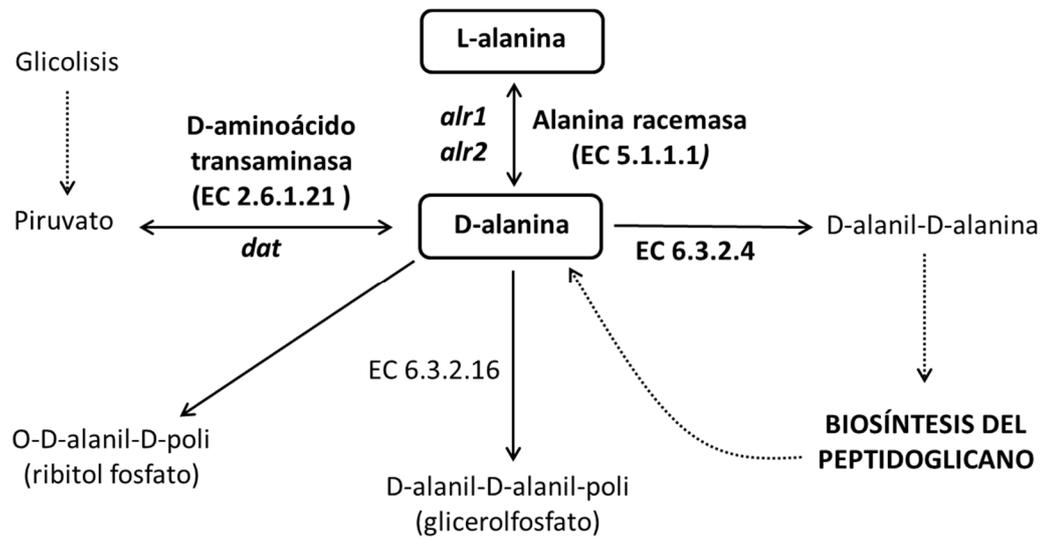


Figura 2

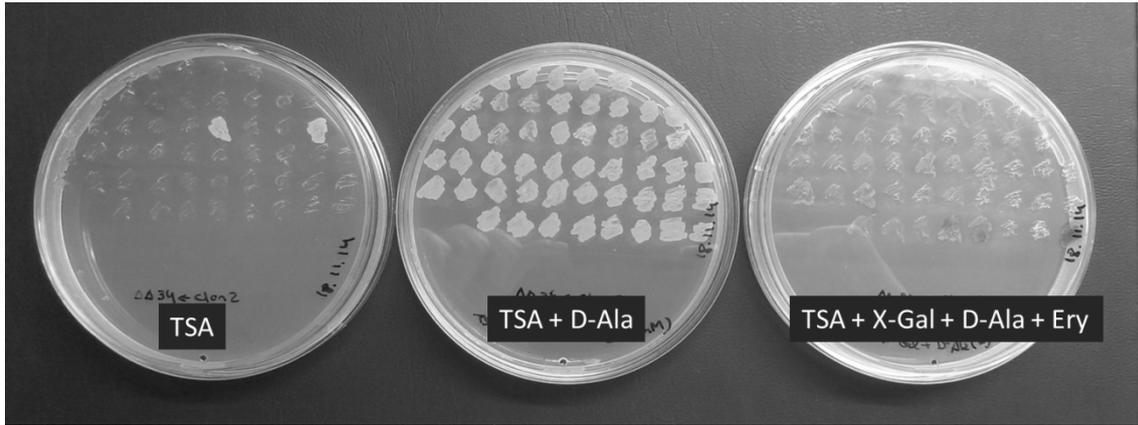


Figura 4

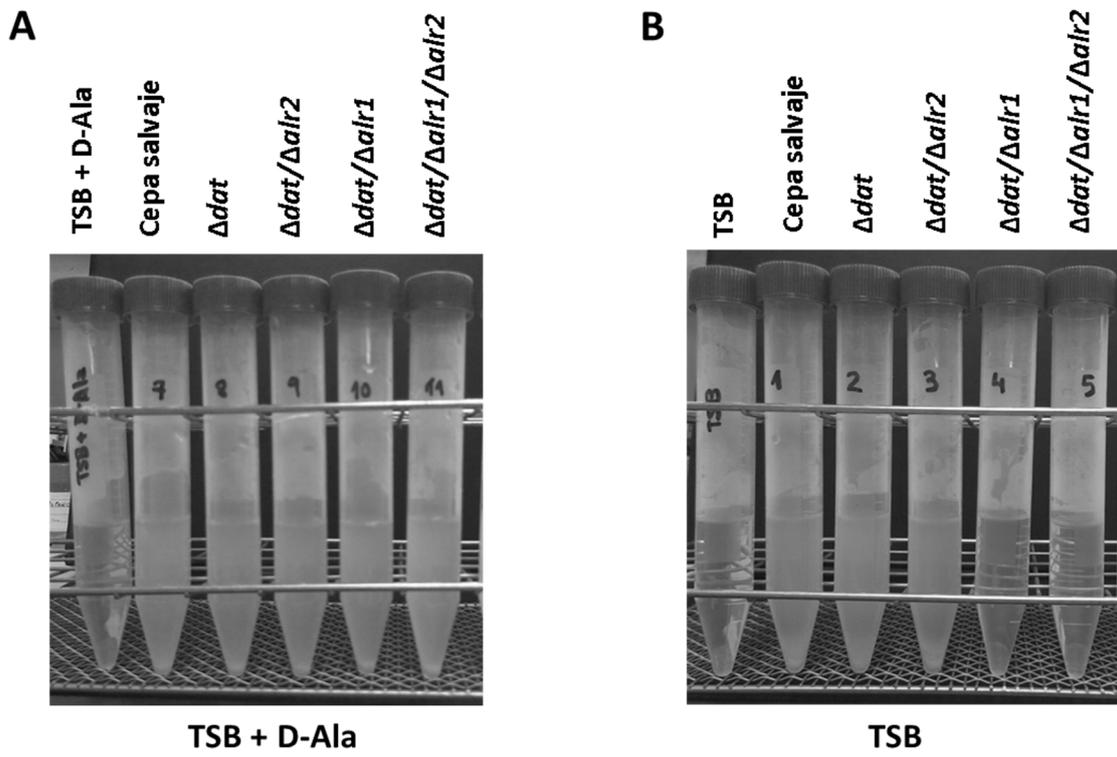


Figura 5

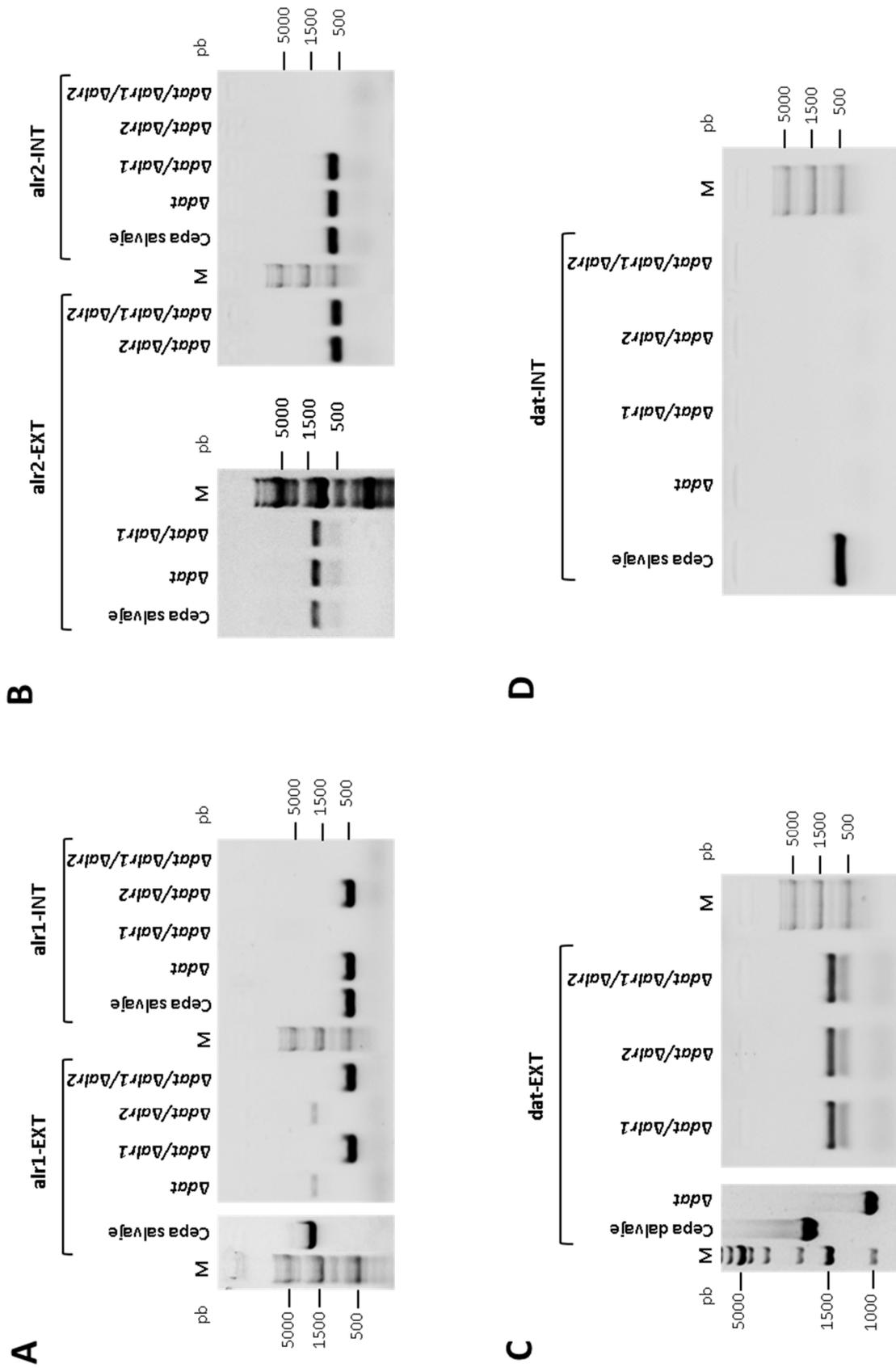


Figura 6

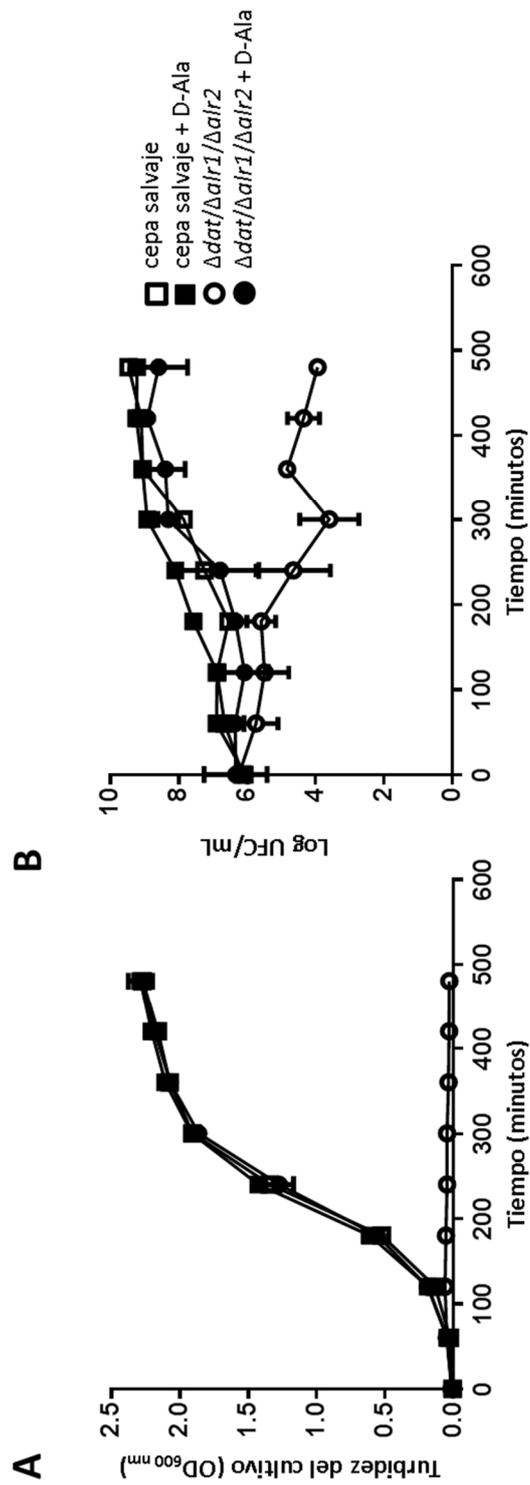


Figura 7

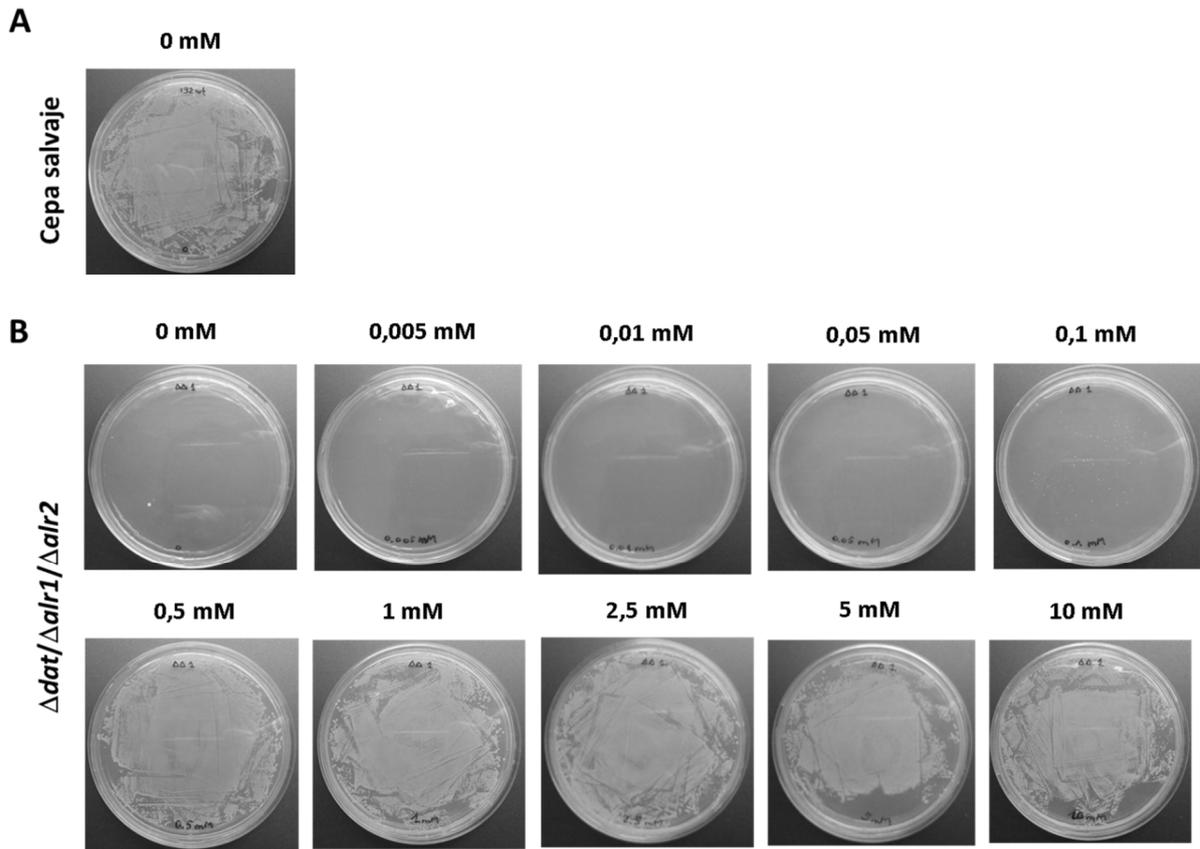


Figura 8

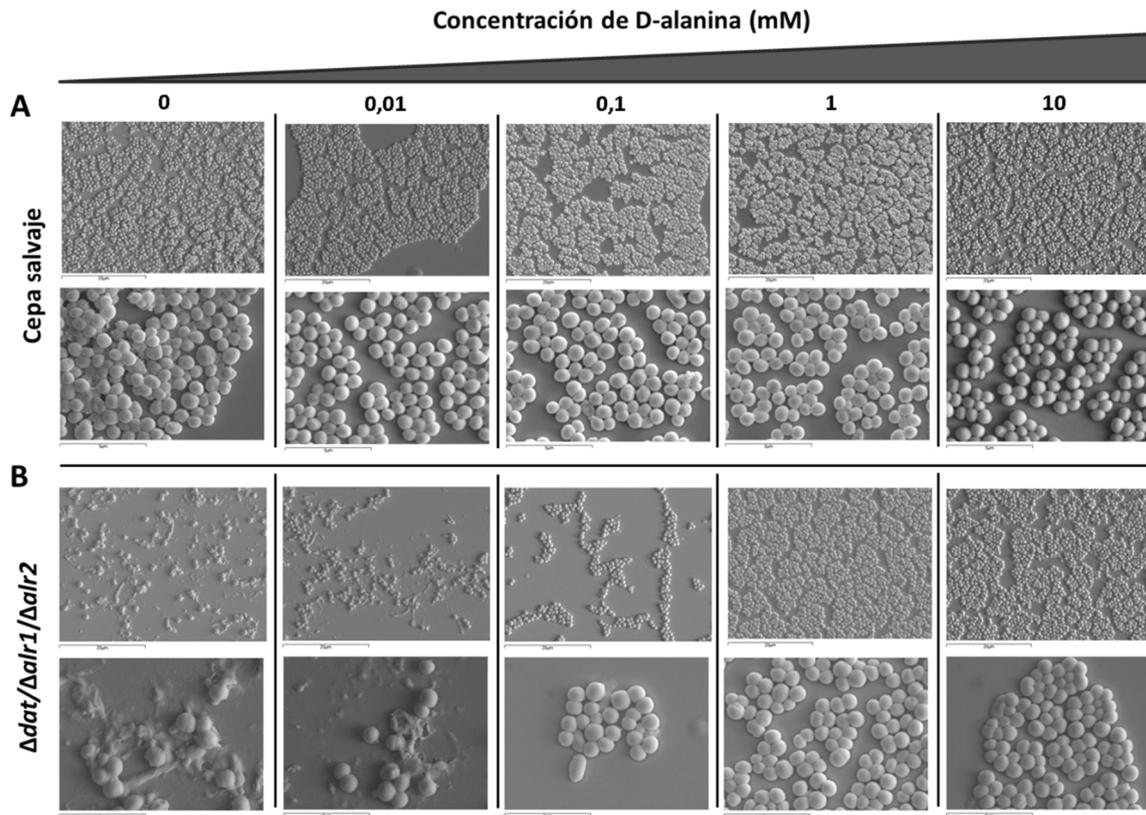


Figura 9

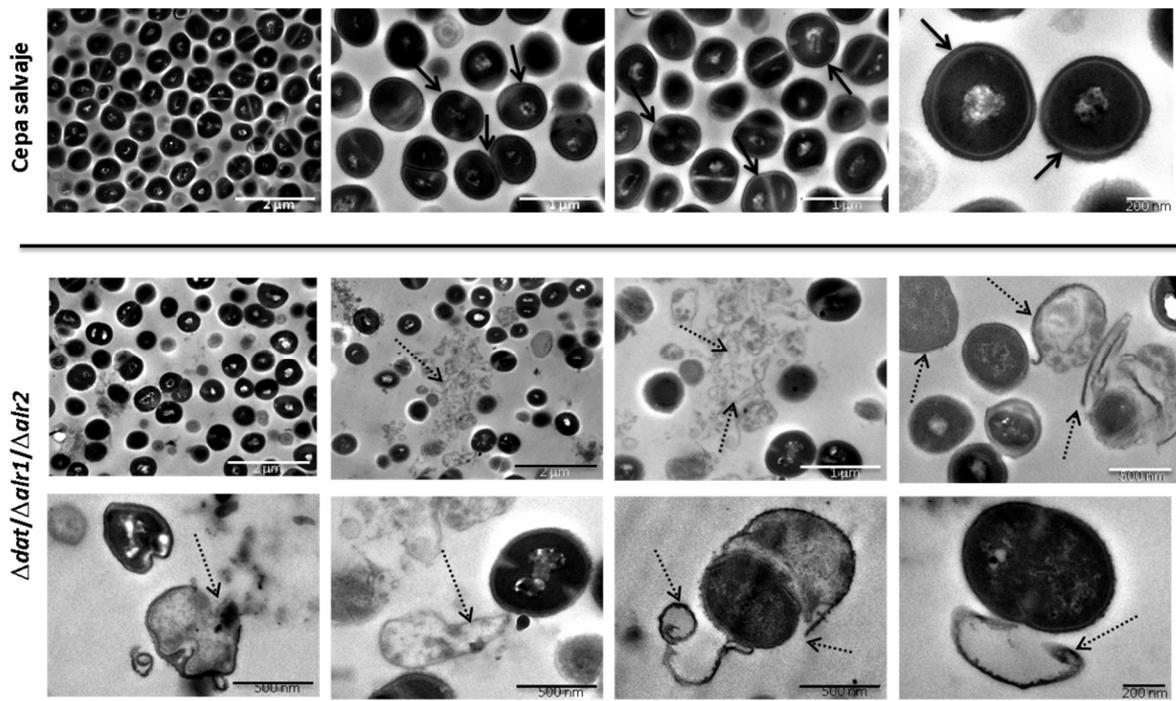


Figura 10

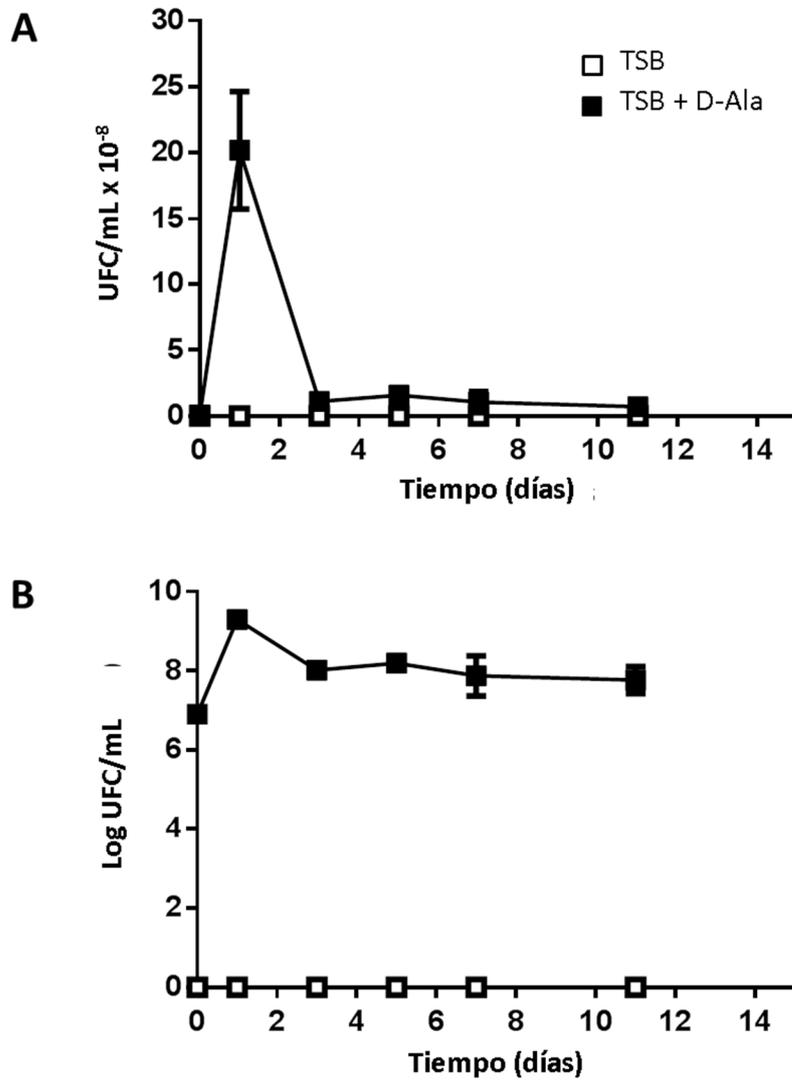


Figura 11

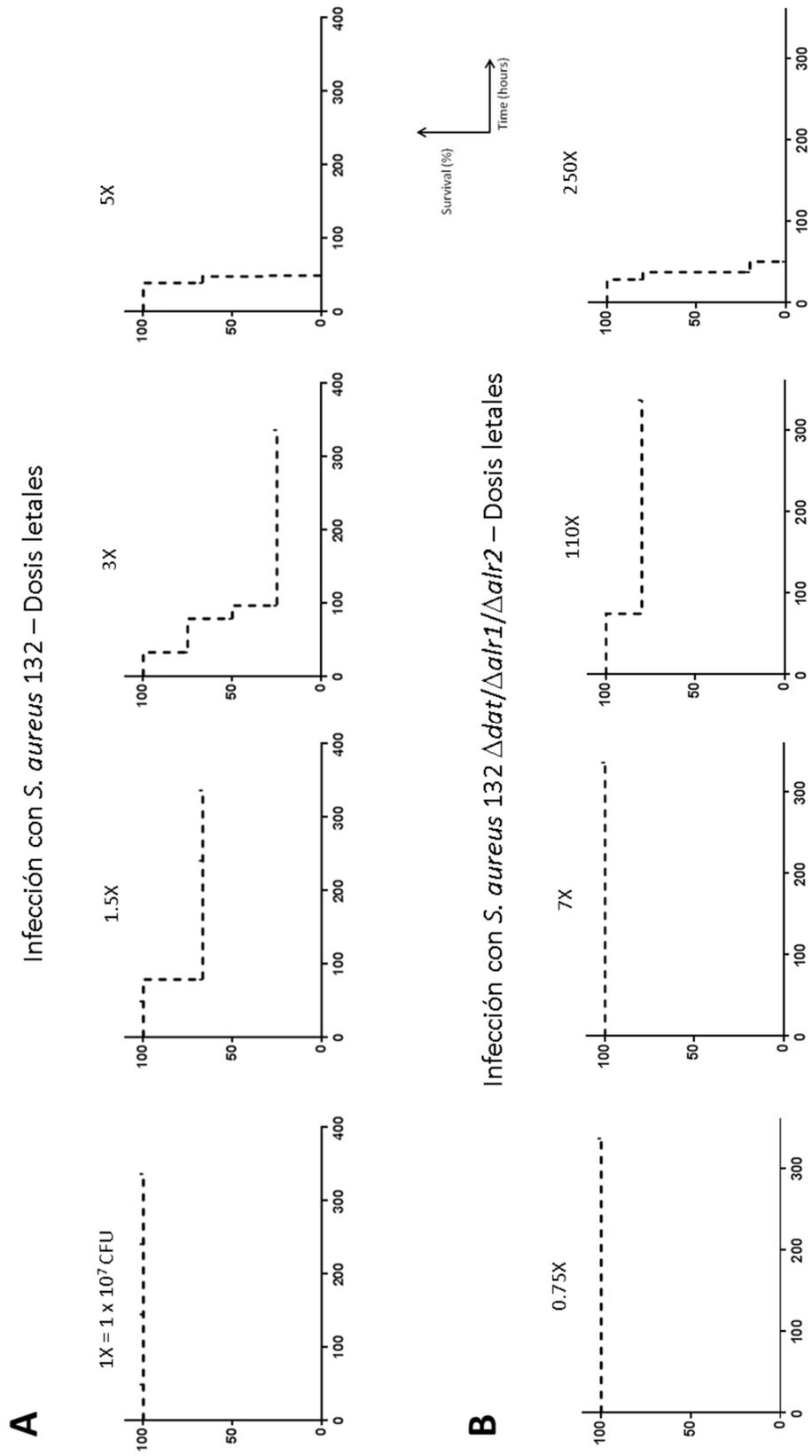


Figura 12

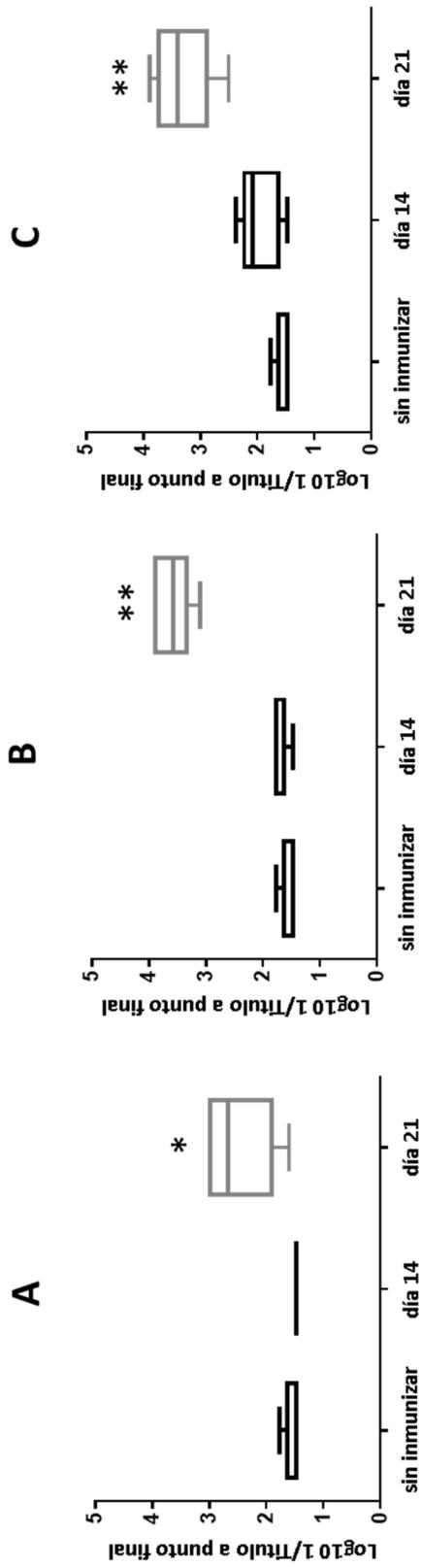


Figura 13

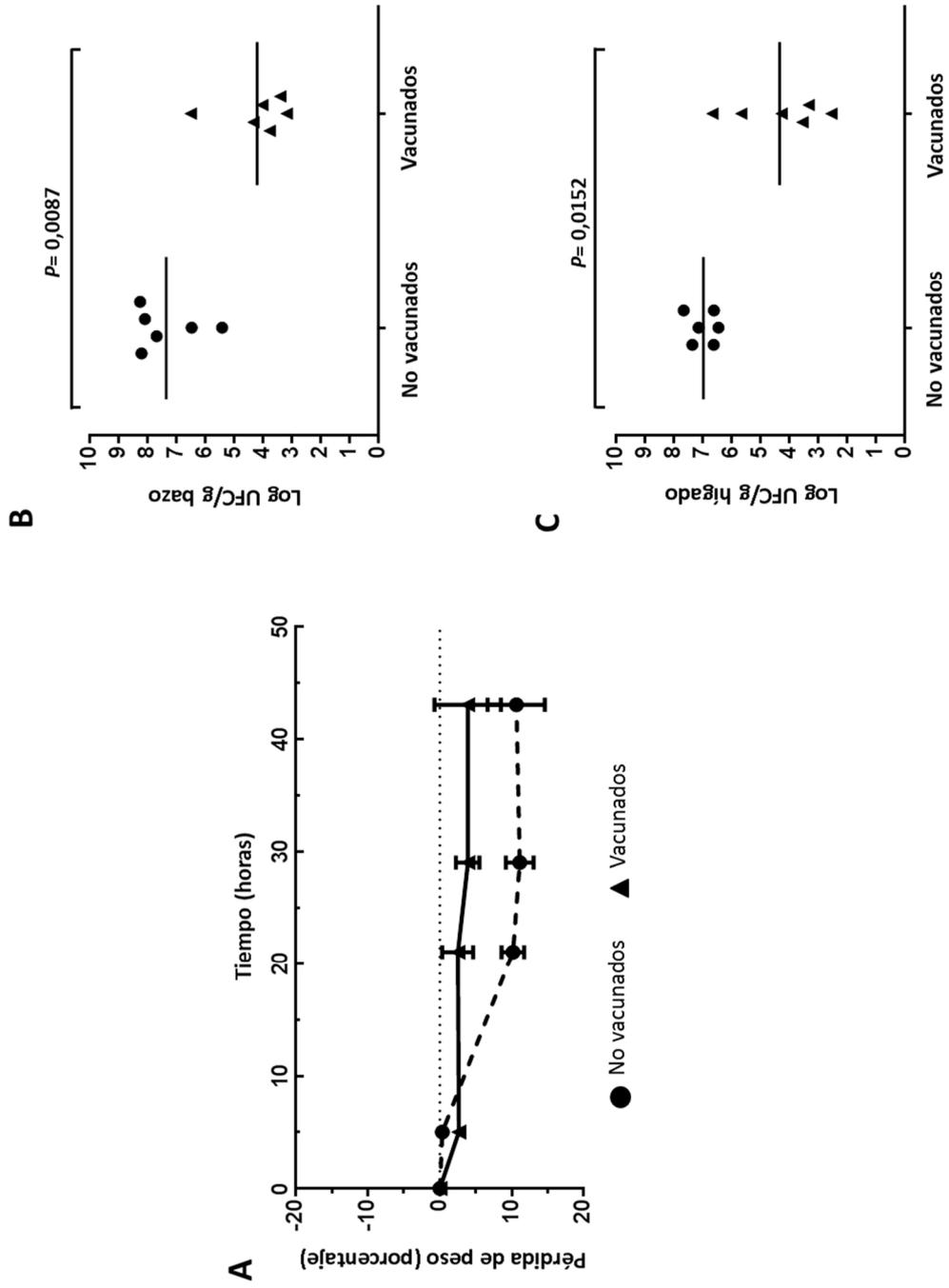


Figura 14

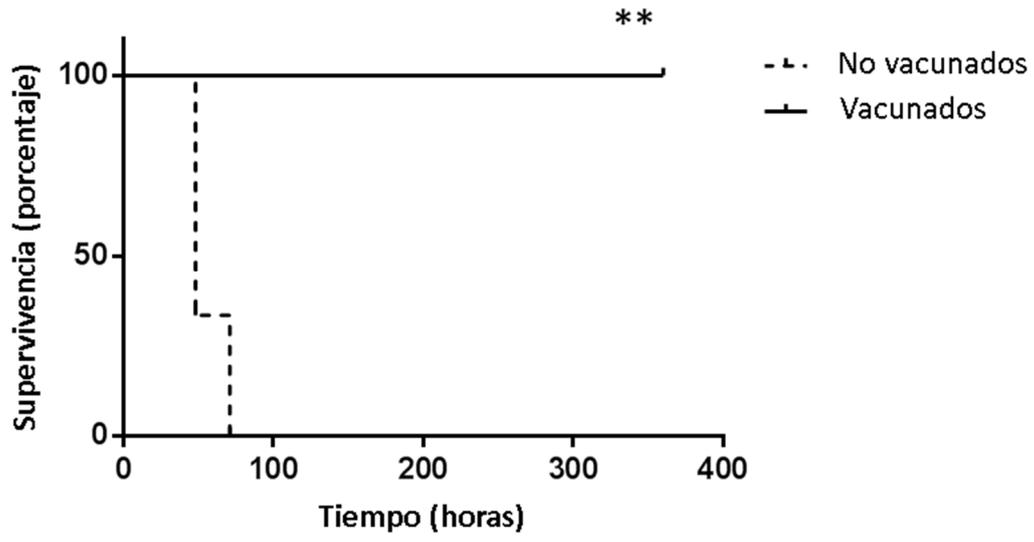


Figura 15

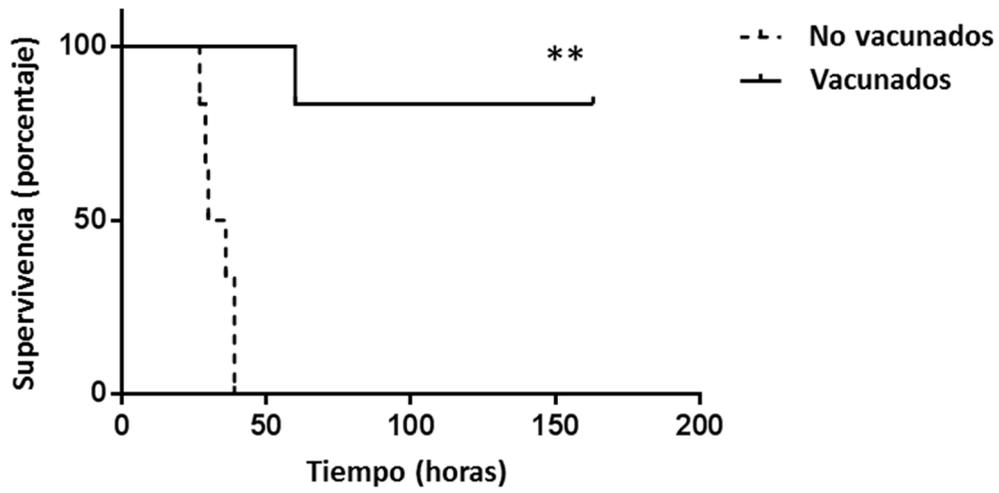
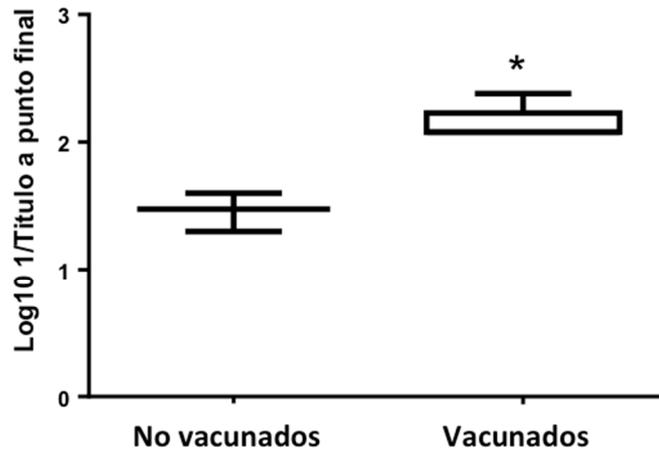


Figura 16

A

USA300LAC (cepa clínica y epidémica)



B

RF122 (cepa de origen bovino)

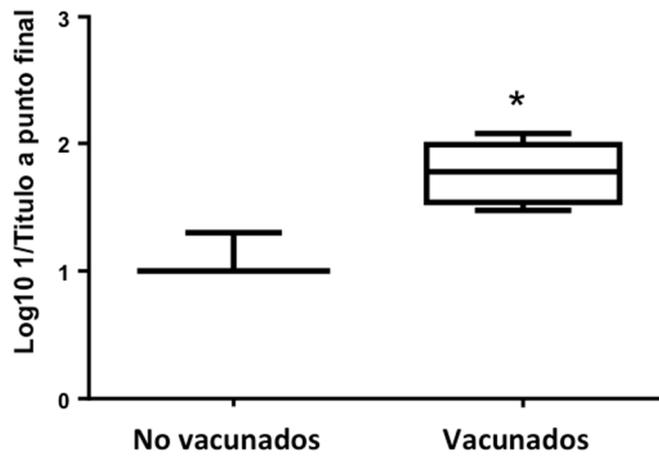


Figura 17

ES 2 586 979 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Fundación Profesor Novoa Santos
 <120> VACUNAS VIVAS ATENUADAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS
 <130> 900748
 <160> 38
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(382)
 <223> La alanina racemasa Alr1 de Staphylococcus aureus 132
 (ALR1_STAPH132)

 <400> 1
 Met Ser Asp Lys Tyr Tyr Arg Ser Ala Tyr Met Asn Val Asp Leu Asn
 1 5 10 15
 Ala Val Ala Ser Asn Phe Lys Val Phe Ser Thr Leu His Pro Asn Lys
 20 25 30
 Thr Val Met Ala Val Val Lys Ala Asn Ala Tyr Gly Leu Gly Ser Val
 35 40 45
 Lys Val Ala Arg His Leu Met Glu Asn Gly Ala Thr Phe Phe Ala Val
 50 55 60
 Ala Thr Leu Asp Glu Ala Ile Glu Leu Arg Met His Gly Ile Thr Ala
 65 70 75 80
 Lys Ile Leu Val Leu Gly Val Leu Pro Ala Lys Asp Ile Asp Lys Ala
 85 90 95
 Ile Gln His Arg Val Ala Leu Thr Val Pro Ser Lys Gln Trp Leu Lys
 100 105 110
 Glu Ala Ile Lys Asn Ile Ser Gly Glu Gln Glu Lys Lys Leu Trp Leu
 115 120 125
 His Ile Lys Leu Asp Thr Gly Met Gly Arg Leu Gly Ile Lys Asp Thr
 130 135 140
 Lys Thr Tyr Gln Glu Val Ile Glu Ile Ile Gln Gln Tyr Glu Gln Leu
 145 150 155 160
 Val Phe Glu Gly Val Phe Thr His Phe Ala Cys Ala Asp Glu Pro Gly
 165 170 175

ES 2 586 979 B1

Asp Met Thr Thr Glu Gln Tyr Gln Arg Phe Lys Asp Met Val Asn Glu
180 185 190

Ala Ile Lys Pro Glu Tyr Ile His Cys Gln Asn Ser Ala Gly Ser Leu
195 200 205

Leu Met Asp Cys Gln Phe Cys Asn Ala Ile Arg Pro Gly Ile Ser Leu
210 215 220

Tyr Gly Tyr Tyr Pro Ser Glu Tyr Val Gln Gln Lys Val Lys Val His
225 230 235 240

Leu Lys Pro Ser Val Gln Leu Ile Ala Asn Val Val Gln Thr Lys Thr
245 250 255

Leu Gln Ala Gly Glu Ser Val Ser Tyr Gly Ala Thr Tyr Thr Ala Thr
260 265 270

Asp Pro Thr Thr Ile Ala Leu Leu Pro Ile Gly Tyr Ala Asp Gly Tyr
275 280 285

Leu Arg Ile Met Gln Gly Ser Phe Val Asn Val Asn Gly His Gln Cys
290 295 300

Glu Val Ile Gly Arg Val Cys Met Asp Gln Thr Ile Val Lys Val Pro
305 310 315 320

Asp Gln Val Lys Ala Gly Asp Ser Val Ile Leu Ile Asp Asn His Arg
325 330 335

Glu Ser Pro Gln Ser Val Glu Val Val Ala Glu Lys Gln His Thr Ile
340 345 350

Asn Tyr Glu Val Leu Cys Asn Leu Ser Arg Arg Leu Pro Arg Ile Tyr
355 360 365

His Asp Gly Asp Gln Arg Phe Val Thr Asn Glu Leu Leu Lys
370 375 380

<210> 2
<211> 361
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(361)
<223> La alanina racemasa Alr2 de Staphylococcus aureus 132
(ALR2_STAPH132)

<400> 2

Leu Thr Ala Thr Trp Ser Val Asn Lys Lys Ile Phe Leu Gln Asn Ala
1 5 10 15

ES 2 586 979 B1

Ile Thr Val Lys Asn Asn Gln Pro Leu Met Ala Val Val Lys Asn Asn
 20 25 30

Ala Tyr His Tyr Asp Leu Glu Phe Ala Val Thr Gln Phe Ile His Ala
 35 40 45

Gly Ile Asp Thr Phe Ser Thr Thr Ser Leu Arg Glu Ala Ile Gln Ile
 50 55 60

Arg Gln Leu Ala Pro Asp Ala Thr Ile Phe Leu Met Asn Ala Val Tyr
 65 70 75 80

Glu Phe Asp Leu Val Arg Glu His Gln Ile His Met Thr Leu Pro Ser
 85 90 95

Leu Thr Tyr Tyr Tyr Asn His Lys Asn Asp Leu Ala Gly Ile His Val
 100 105 110

His Leu Glu Phe Glu Asn Leu Leu His Arg Ser Gly Phe Lys Asp Leu
 115 120 125

Asn Glu Ile Lys Glu Val Leu Lys Asp His His His Asn Gln Asn Ala
 130 135 140

Lys Met Ile Ile Ser Gly Leu Trp Thr His Phe Gly Tyr Ala Asp Glu
 145 150 155 160

Phe Asp Val Ser Asp Tyr Asn Val Glu Arg Ser Gln Trp Met Glu Ile
 165 170 175

Val Glu Ala Leu Leu Ser Glu Gly Tyr Gln Phe Asp Leu Ile His Ala
 180 185 190

Gln Asn Ser Ala Ser Phe Tyr Arg Glu Gly Gln Ile Leu Leu Pro His
 195 200 205

His Thr His Ala Arg Val Gly Ile Ala Leu Tyr Gly Ser Arg Pro Tyr
 210 215 220

Ser Ser Leu Asn Gln His Asp Ile Val Gln Ser Leu Thr Leu Lys Ala
 225 230 235 240

His Val Ile Gln Val Arg Glu Val Gln Ala Gly Asp Tyr Cys Gly Tyr
 245 250 255

Ser Phe Ala Phe Glu Val Thr Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ala Val Val
 260 265 270

Asp Ile Gly Tyr Gly Asp Gly Ile Leu Arg Thr Arg Ala Lys His Glu
 275 280 285

ES 2 586 979 B1

Ala Leu Ile Asn Gly Lys Arg Tyr Pro Ile Arg Ala Leu Met Met Ser
 290 295 300

His Met Phe Val Glu Val Asp Gly Asn Val His Ala Gln Asp Glu Val
 305 310 315 320

Ile Leu Tyr Asn Asn Asp Ile Arg Ile Asp Glu Tyr Thr Phe Lys Gly
 325 330 335

Val Gly Ala Asn Ser Glu Gln Leu Ser Ala Met Asn His Asp Ser Leu
 340 345 350

Lys Lys Glu Tyr Ile Ser Asn Asp Cys
 355 360

<210> 3
 <211> 386
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(386)
 <223> La alanina racemasa Alr de Mycobacterium tuberculosis ATCC 25618
 (ALR_MYCTU)

<400> 3

Met Ala Met Thr Pro Ile Ser Gln Thr Pro Gly Leu Leu Ala Glu Ala
 1 5 10 15

Met Val Asp Leu Gly Ala Ile Glu His Asn Val Arg Val Leu Arg Glu
 20 25 30

His Ala Gly His Ala Gln Leu Met Ala Val Val Lys Ala Asp Gly Tyr
 35 40 45

Gly His Gly Ala Thr Arg Val Ala Gln Thr Ala Leu Gly Ala Gly Ala
 50 55 60

Ala Glu Leu Gly Val Ala Thr Val Asp Glu Ala Leu Ala Leu Arg Ala
 65 70 75 80

Asp Gly Ile Thr Ala Pro Val Leu Ala Trp Leu His Pro Pro Gly Ile
 85 90 95

Asp Phe Gly Pro Ala Leu Leu Ala Asp Val Gln Val Ala Val Ser Ser
 100 105 110

Leu Arg Gln Leu Asp Glu Leu Leu His Ala Val Arg Arg Thr Gly Arg
 115 120 125

Thr Ala Thr Val Thr Val Lys Val Asp Thr Gly Leu Asn Arg Asn Gly
 130 135 140

ES 2 586 979 B1

Val Gly Pro Ala Gln Phe Pro Ala Met Leu Thr Ala Leu Arg Gln Ala
 145 150 155 160

Met Ala Glu Asp Ala Val Arg Leu Arg Gly Leu Met Ser His Met Val
 165 170 175

Tyr Ala Asp Lys Pro Asp Asp Ser Ile Asn Asp Val Gln Ala Gln Arg
 180 185 190

Phe Thr Ala Phe Leu Ala Gln Ala Arg Glu Gln Gly Val Arg Phe Glu
 195 200 205

Val Ala His Leu Ser Asn Ser Ser Ala Thr Met Ala Arg Pro Asp Leu
 210 215 220

Thr Phe Asp Leu Val Arg Pro Gly Ile Ala Val Tyr Gly Leu Ser Pro
 225 230 235 240

Val Pro Ala Leu Gly Asp Met Gly Leu Val Pro Ala Met Thr Val Lys
 245 250 255

Cys Ala Val Ala Leu Val Lys Ser Ile Arg Ala Gly Glu Gly Val Ser
 260 265 270

Tyr Gly His Thr Trp Ile Ala Pro Arg Asp Thr Asn Leu Ala Leu Leu
 275 280 285

Pro Ile Gly Tyr Ala Asp Gly Val Phe Arg Ser Leu Gly Gly Arg Leu
 290 295 300

Glu Val Leu Ile Asn Gly Arg Arg Cys Pro Gly Val Gly Arg Ile Cys
 305 310 315 320

Met Asp Gln Phe Met Val Asp Leu Gly Pro Gly Pro Leu Asp Val Ala
 325 330 335

Glu Gly Asp Glu Ala Ile Leu Phe Gly Pro Gly Ile Arg Gly Glu Pro
 340 345 350

Thr Ala Gln Asp Trp Ala Asp Leu Val Gly Thr Ile His Tyr Glu Val
 355 360 365

Val Thr Ser Pro Arg Gly Arg Ile Thr Arg Thr Tyr Arg Glu Ala Glu
 370 375 380

Asn Arg
 385

<210> 4
 <211> 367
 <212> PRT

ES 2 586 979 B1

<213> Streptococcus pneumoniae

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(367)

<223> La alanina racemasa Alr de Streptococcus pneumoniae serotipo 4
(ALR_STRPN)

<400> 4

Met Lys Ala Ser Pro His Arg Pro Thr Lys Ala Leu Ile His Leu Gly
1 5 10 15

Ala Ile Arg Gln Asn Ile Gln Gln Met Gly Ala His Ile Pro Gln Gly
20 25 30

Thr Leu Lys Leu Ala Val Val Lys Ala Asn Ala Tyr Gly His Gly Ala
35 40 45

Val Ala Val Ala Lys Ala Ile Gln Asp Asp Val Asp Gly Phe Cys Val
50 55 60

Ser Asn Ile Asp Glu Ala Ile Glu Leu Arg Gln Ala Gly Leu Ser Lys
65 70 75 80

Pro Ile Leu Ile Leu Gly Val Ser Glu Ile Glu Ala Val Ala Leu Ala
85 90 95

Lys Glu Tyr Asp Phe Thr Leu Thr Val Ala Gly Leu Glu Trp Ile Gln
100 105 110

Ala Leu Leu Asp Lys Glu Val Asp Leu Thr Gly Leu Thr Val His Leu
115 120 125

Lys Ile Asp Ser Gly Met Gly Arg Ile Gly Phe Arg Glu Ala Ser Glu
130 135 140

Val Glu Gln Ala Gln Asp Leu Leu Gln Gln His Gly Val Cys Val Glu
145 150 155 160

Gly Ile Phe Thr His Phe Ala Thr Ala Asp Glu Glu Ser Asp Asp Tyr
165 170 175

Phe Asn Ala Gln Leu Glu Arg Phe Lys Thr Ile Leu Ala Ser Met Lys
180 185 190

Glu Val Pro Glu Leu Val His Ala Ser Asn Ser Ala Thr Thr Leu Trp
195 200 205

His Val Glu Thr Ile Phe Asn Ala Val Arg Met Gly Asp Ala Met Tyr
210 215 220

Gly Leu Asn Pro Ser Gly Ala Val Leu Asp Leu Pro Tyr Asp Leu Ile
225 230 235 240

ES 2 586 979 B1

Pro Ala Leu Thr Leu₂₄₅ Glu Ser Ala Leu Val₂₅₀ His Val Lys Thr Val₂₅₅ Pro

Ala Gly Ala Cys₂₆₀ Met Gly Tyr Gly Ala₂₆₅ Thr Tyr Gln Ala Asp₂₇₀ Ser Glu

Gln Val Ile₂₇₅ Ala Thr Val Pro Ile₂₈₀ Gly Tyr Ala Asp Gly₂₈₅ Trp Thr Arg

Asp Met₂₉₀ Gln Asn Phe Ser Val₂₉₅ Leu Val Asp Gly Gln Ala Cys Pro Ile

Val₃₀₅ Gly Arg Val Ser Met₃₁₀ Asp Gln Ile Thr Ile₃₁₅ Arg Leu Pro Lys Leu₃₂₀

Tyr Pro Leu Gly Thr₃₂₅ Lys Val Thr Leu Ile₃₃₀ Gly Ser Asn Gly Asp₃₃₅ Lys

Glu Ile Thr Ala₃₄₀ Thr Gln Val Ala Thr₃₄₅ Tyr Arg Val Thr Ile₃₅₀ Asn Tyr

Glu Val Val₃₅₅ Cys Leu Leu Ser Asp₃₆₀ Arg Ile Pro Arg Glu₃₆₅ Tyr Tyr

<210> 5
<211> 368
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(368)
<223> La alanina racemasa Alr de Listeria monocytogenes serotipo 4b
(ALR_LISMC)

<400> 5

Met Val Thr Gly Trp His Arg Pro Thr Trp Ile Glu Ile Asp Arg Ala
1 5 10 15

Ala Ile Arg Glu Asn Ile Lys Asn Glu Gln Asn Lys Leu Pro Glu Asn
20 25 30

Val Asp Leu Trp Ala Val Val Lys Ala Asn Ala Tyr Gly His Gly Ile
35 40 45

Ile Glu Val Ala Arg Thr Ala Lys Glu Ala Gly Ala Lys Gly Phe Cys
50 55 60

Val Ala Ile Leu Asp Glu Ala Leu Ala Leu Arg Glu Ala Gly Phe Gln
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ile Leu Val Leu Gly Ala Thr Arg Lys Glu Asp Ala Asn
7

ES 2 586 979 B1

<210> 6
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(389)
 <223> La alanina racemasa Alr1 de Bacillus subtilis 168 (ALR1_BACSU)

<400> 6

Met Ser Thr Lys Pro Phe Tyr Arg Asp Thr Trp Ala Glu Ile Asp Leu
 1 5 10 15

Ser Ala Ile Lys Glu Asn Val Ser Asn Met Lys Lys His Ile Gly Glu
 20 25 30

His Val His Leu Met Ala Val Val Lys Ala Asn Ala Tyr Gly His Gly
 35 40 45

Asp Ala Glu Thr Ala Lys Ala Ala Leu Asp Ala Gly Ala Ser Cys Leu
 50 55 60

Ala Val Ala Ile Leu Asp Glu Ala Ile Ser Leu Arg Lys Lys Gly Leu
 65 70 75 80

Lys Ala Pro Ile Leu Val Leu Gly Ala Val Pro Pro Glu Tyr Val Ala
 85 90 95

Ile Ala Ala Glu Tyr Asp Val Thr Leu Thr Gly Tyr Ser Val Glu Trp
 100 105 110

Leu Gln Glu Ala Ala Arg His Thr Lys Lys Gly Ser Leu His Phe His
 115 120 125

Leu Lys Val Asp Thr Gly Met Asn Arg Leu Gly Val Lys Thr Glu Glu
 130 135 140

Glu Val Gln Asn Val Met Ala Ile Leu Asp Arg Asn Pro Arg Leu Lys
 145 150 155 160

Cys Lys Gly Val Phe Thr His Phe Ala Thr Ala Asp Glu Lys Glu Arg
 165 170 175

Gly Tyr Phe Leu Met Gln Phe Glu Arg Phe Lys Glu Leu Ile Ala Pro
 180 185 190

Leu Pro Leu Lys Asn Leu Met Val His Cys Ala Asn Ser Ala Ala Gly
 195 200 205

Leu Arg Leu Lys Lys Gly Phe Phe Asn Ala Val Arg Phe Gly Ile Gly
 210 215 220

ES 2 586 979 B1

Met Tyr Gly Leu Arg Pro Ser Ala Asp Met Ser Asp Glu Ile Pro Phe
225 230 235 240

Gln Leu Arg Pro Ala Phe Thr Leu His Ser Thr Leu Ser His Val Lys
245 250 255

Leu Ile Arg Lys Gly Glu Ser Val Ser Tyr Gly Ala Glu Tyr Thr Ala
260 265 270

Glu Lys Asp Thr Trp Ile Gly Thr Val Pro Val Gly Tyr Ala Asp Gly
275 280 285

Trp Leu Arg Lys Leu Lys Gly Thr Asp Ile Leu Val Lys Gly Lys Arg
290 295 300

Leu Lys Ile Ala Gly Arg Ile Cys Met Asp Gln Phe Met Val Glu Leu
305 310 315 320

Asp Gln Glu Tyr Pro Pro Gly Thr Lys Val Thr Leu Ile Gly Arg Gln
325 330 335

Gly Asp Glu Tyr Ile Ser Met Asp Glu Ile Ala Gly Arg Leu Glu Thr
340 345 350

Ile Asn Tyr Glu Val Ala Cys Thr Ile Ser Ser Arg Val Pro Arg Met
355 360 365

Phe Leu Glu Asn Gly Ser Ile Met Glu Val Arg Asn Pro Leu Leu Gln
370 375 380

Val Asn Ile Ser Asn
385

<210> 7
<211> 394
<212> PRT
<213> Bacillus subtilis

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(394)
<223> La alanina racemasa Alr2 de Bacillus subtilis 168 (ALR2_BACSU)

<400> 7

Met Ile Lys Leu Cys Arg Glu Val Trp Ile Glu Val Asn Leu Asp Ala
1 5 10 15

Val Lys Lys Asn Leu Arg Ala Ile Arg Arg His Ile Pro His Lys Ser
20 25 30

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

ES 2 586 979 B1

Glu Val Ala Arg His Ala Leu Glu His Gly Ala Ser Glu Leu Ala Val
 50 55 60
 Ala Ser Val Glu Glu Gly Ile Val Leu Arg Lys Ala Gly Ile Thr Ala
 65 70 75 80
 Pro Ile Leu Val Leu Gly Phe Thr Ser Leu Ser Cys Val Lys Lys Ser
 85 90 95
 Ala Ala Trp Asn Ile Thr Leu Ser Ala Phe Gln Val Asp Trp Met Lys
 100 105 110
 Glu Ala Asn Glu Ile Leu Glu Lys Glu Ala Ser Ala Asn Arg Leu Ala
 115 120 125
 Ile His Ile Asn Val Asp Thr Gly Met Gly Arg Leu Gly Val Arg Thr
 130 135 140
 Lys Glu Glu Leu Leu Glu Val Val Lys Ala Leu Lys Ala Ser Lys Phe
 145 150 155 160
 Leu Arg Trp Thr Gly Ile Phe Thr His Phe Ser Thr Ala Asp Glu Pro
 165 170 175
 Asp Thr Thr Leu Thr Lys Leu Gln His Glu Lys Phe Ile Ser Phe Leu
 180 185 190
 Ser Phe Leu Lys Lys Gln Gly Ile Glu Leu Pro Thr Val His Met Cys
 195 200 205
 Asn Thr Ala Ala Ala Ile Ala Phe Pro Glu Phe Ser Ala Asp Met Ile
 210 215 220
 Arg Leu Gly Ile Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Pro Ser Ala Tyr Ile Lys
 225 230 235 240
 Gln Leu Asn Leu Val Lys Leu Glu Pro Ala Leu Ser Leu Lys Ala Arg
 245 250 255
 Ile Ala Tyr Val Lys Thr Met Arg Thr Glu Pro Arg Thr Val Ser Tyr
 260 265 270
 Gly Ala Thr Tyr Ile Ala Glu Pro Asn Glu Val Ile Ala Thr Leu Pro
 275 280 285
 Ile Gly Tyr Ala Asp Gly Tyr Ser Arg Ala Leu Ser Asn Arg Gly Phe
 290 295 300
 Val Leu His Arg Gly Lys Arg Val Pro Val Ala Gly Arg Val Thr Met
 305 310 315 320

ES 2 586 979 B1

Asp Met Ile Met Val Ser Leu Gly Glu Asn Gly Glu Gly Lys Gln Gly
325 330 335

Asp Glu Val Val Ile Tyr Gly Lys Gln Lys Gly Ala Glu Ile Ser Val
340 345 350

Asp Glu Val Ala Glu Met Leu Asn Thr Ile Asn Tyr Glu Val Val Ser
355 360 365

Thr Leu Ser Arg Arg Ile Pro Arg Phe Tyr Ile Arg Asp Gly Glu Ile
370 375 380

Phe Lys Val Ser Thr Pro Val Leu Tyr Val
385 390

<210> 8
<211> 282
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(282)
<223> La D-aminoácido transaminasa Dat de Staphylococcus aureus 132
(DAT)

<400> 8

Met Glu Lys Ile Phe Leu Asn Gly Glu Phe Val Ser Pro Ser Glu Ala
1 5 10 15

Lys Val Ser Tyr Asn Asp Arg Gly Tyr Val Phe Gly Asp Gly Ile Tyr
20 25 30

Glu Tyr Ile Arg Val Tyr Asn Gly Lys Leu Phe Thr Val Thr Glu His
35 40 45

Tyr Glu Arg Phe Leu Arg Ser Ala Asn Glu Ile Gly Leu Asp Leu Asn
50 55 60

Tyr Ser Val Glu Glu Leu Ile Glu Leu Ser Arg Lys Leu Val Asp Met
65 70 75 80

Asn Gln Ile Glu Thr Gly Ala Ile Tyr Ile Gln Ala Thr Arg Gly Val
85 90 95

Ala Glu Arg Asn His Ser Phe Pro Thr Pro Glu Val Glu Pro Ala Ile
100 105 110

Val Ala Tyr Thr Lys Ser Tyr Asp Arg Pro Tyr Asp His Leu Glu Asn
115 120 125

Gly Val Asn Gly Val Thr Val Glu Asp Ile Arg Trp Leu Arg Cys Asp
130 135 140

ES 2 586 979 B1

Ile Lys Ser Leu Asn Leu Leu Gly Asn Val Leu Ala Lys Glu Tyr Ala
 145 150 155 160

Val Lys Tyr Asn Ala Val Glu Ala Ile Gln His Arg Gly Glu Thr Val
 165 170 175

Thr Glu Gly Ser Ser Ser Asn Ala Tyr Ala Ile Lys Asp Gly Val Ile
 180 185 190

Tyr Thr His Pro Ile Asn Asn Tyr Ile Leu Asn Gly Ile Thr Arg Ile
 195 200 205

Val Ile Lys Lys Ile Ala Glu Asp Tyr Asn Ile Pro Phe Lys Glu Glu
 210 215 220

Thr Phe Thr Val Asp Phe Leu Lys Asn Ala Asp Glu Val Ile Val Ser
 225 230 235 240

Ser Thr Ser Ala Glu Val Thr Pro Val Ile Lys Leu Asp Gly Glu Pro
 245 250 255

Val Asn Asp Gly Lys Val Gly Pro Ile Thr Arg Gln Leu Gln Glu Gly
 260 265 270

Phe Glu Lys Tyr Ile Glu Ser His Ser Ile
 275 280

<210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> a1r1UP-F(MluI):

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)

<400> 9
 cccacgcgtc attacttaaa cgcaaca

27

<210> 10
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> : a1r1UP-R(NotI)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)

<400> 10

cccgcggccg cattacttcc tcctgtaat 29

<210> 11
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> a1r1DN-F(NotI)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)

<400> 11
 ccgcgccg ctatggcag tgcataaa 29

<210> 12
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> a1r1DN-R(BglII)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)

<400> 12
 ccagatctc ttccacgatt agttg 25

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> a1r1-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

<400> 13
 cgagttgcct taacggtcc 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> a1r1-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

<400> 14
 acagactcac ccgctttag 20

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> a1r1Ext-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

<400> 15
 gcattaggca caggcttagg 20

<210> 16
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> a1r1Ext-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)

<400> 16
 aatcgcatgc ttcacactc 19

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> a1r1UP-Fseq

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

<400> 17
 tccagaattt cgagctattg 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> a1r1DN-Rseq

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

<400> 18
 tcacttcgtc agtgatttc 20

<210> 19
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> a1r2UP-F(MluI)

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)

 <400> 19
 cccacgcgtg tcattgcata cttagaa 27

 <210> 20
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> a1r2UP-R(NotI)

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)

 <400> 20
 cccgcggccg ctgtattaca cctctttgt 29

 <210> 21
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> ar12b-DN-F (NotI)

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)

 <400> 21
 cccgcggccg caggagtaca tttcaaatg 29

 <210> 22
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> a1r2DN-R(BglII)

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)

 <400> 22
 cccagatctc tgcttcttca tttctat 27

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> a1r2-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

<400> 23
 agtccgtgaa catcaaatac 20

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> a1r2-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

<400> 24
 ctataaccgc aataatcacc 20

<210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> a1r2Ext-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

<400> 25
 gtctatgaca aaccaacgcc 20

<210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> a1r2Ext-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

<400> 26
 cctcagctac aagtttgacc 20

<210> 27

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> a1r2UP-Fseq

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)

 <400> 27
 catcaacatc ctgaattaag c 21

 <210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> a1r2DN-Rseq

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)

 <400> 28
 gatgaaggta atttagcgtc 20

 <210> 29
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> datUP (MluI) F

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)

 <400> 29
 cccacgcgtg aaacgtattc atatgat 27

 <210> 30
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> datUP (NotI) R

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(28)

 <400> 30
 cccgcggccg catattattc ctccacgc 28

 <210> 31
 <211> 29

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> datDOWN (NotI) F
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)
 <400> 31
 cccgcggccg caattctttc atcatattt 29
 <210> 32
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> datDOWN (BglII) R
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 <400> 32
 cccagatctg cgaatctaaa ctcggtta 27
 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> DatF
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <400> 33
 tattcaagca acgcgtggtg 20
 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> DatR
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <400> 34
 agttgacgtg taattgggcc 20
 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> datExtF

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <400> 35
 gtcattgggtg acgtgacaac 20

 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> datExtR

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <400> 36
 gcaccacctg ctgaatcaag 20

 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> datseqF

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <400> 37
 gccggttgta acagaagatg 20

 <210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> datseqR

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <400> 38
 caattgccgg gtctgcaatc 20



- ②① N.º solicitud: 201530508
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.04.2015
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	COLLINS L VINCENT et al. " <i>Staphylococcus aureus</i> strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice" Journal of Infectious Diseases 15 July, 2002 15/07/2002 VOL: 186 No: 2 Paginas: 214-219 ISSN 0022-1899; apartados de resultados y discusión	1-12
Y	WO 9925376 A1 (UNIV PENNSYLVANIA) 27/05/1999, Ejemplos.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 27.09.2016</p>	<p>Examinador M. d. García Coca</p>	<p>Página 1/4</p>
---	--	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/21 (2006.01)
A61K39/085 (2006.01)
A61K39/40 (2006.01)
C12R1/445 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/ELSEVIER, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.09.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	COLLINS L VINCENT et al. " <i>Staphylococcus aureus</i> strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice" Journal of Infectious Diseases 15 July, 2002 15/07/2002 VOL: 186 No: 2 Paginas: 214-219 ISSN 0022-1899.	15.07.2002
D02	WO 9925376 A1 (UNIV PENNSYLVANIA)	27.05.1999

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El documento D01 es el documento más cercano del estado de la técnica al objeto de la invención. En el documento D01 se divulga un método para la obtención de cepas vivas atenuadas de *Staphylococcus aureus*. El método se basa en la inactivación del operón *dlt* que media la incorporación de D-alanina a los ácidos teicoicos de la pared celular de las bacterias Gram positivas como *Staphylococcus* y *Listeria* entre otros, contribuyendo a la carga negativa de la pared celular. Mediante este método se obtienen cepas vivas atenuadas de *Staphylococcus aureus* con alta susceptibilidad a las proteínas alfa-defensinas de los neutrófilos humanos, y por lo tanto son más susceptibles a ser eliminadas por el sistema inmune.

La diferencia entre lo divulgado en el documento D01 y el objeto de la invención, es el método utilizado para la obtención de cepas vivas atenuadas de *Staphylococcus aureus*, que además sean auxótrofas en D-alanina. Por lo tanto, se considera que el problema técnico a resolver sería la obtención de un nuevo método para la obtención de cepas vivas atenuadas de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, el método objeto de la invención ya está divulgado en el documento D02.

El documento D02 divulga un método para la obtención de cepas vivas atenuadas de *Listeria* auxótrofas para D-alanina. El método consiste en la inactivación de los genes que codifican la alanina racemasa y los genes que codifican la D-aminoácido transaminasa. Estas cepas son utilizadas para la obtención de vacunas. Este método también es útil para la obtención de cepas vivas auxótrofas para otros metabolitos implicados en la pared celular de las bacterias.

Un experto en la materia intentaría la obtención de cepas vivas atenuadas de *Staphylococcus aureus* deficientes en D-alanina en la pared bacteriana (D01) mediante la inactivación de los genes que codifican la alanina racemasa y los genes que codifican la D-aminoácido transaminasa (D02) con una expectativa razonable de éxito.

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados del estado de la técnica, el objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-12, aunque es nueva en el sentido del art. 6.1 LP, carece de actividad inventiva en el sentido del art. 8.1 LP.

En consecuencia, se considera que la invención según se define en las reivindicaciones 1-12 no cumple los requisitos de patentabilidad establecidos en el art. 4.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.