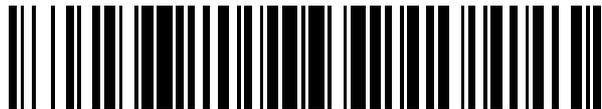


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 953**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2009 PCT/EP2009/051033**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2009 WO09095453**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2009 E 09705327 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2244722**

54 Título: **Tratamiento de infecciones microbianas**

30 Prioridad:

31.01.2008 IE 20080070
31.01.2008 GB 0801768

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.02.2017

73 Titular/es:

**THE PROVOST, FELLOWS, FOUNDATION
SCHOLARS, & THE OTHER MEMBERS OF
BOARD, OF THE COLLEGE OF THE HOLY &
UNDIV. TRINITY OF QUEEN (100.0%)**
College Green
Dublin 2, IE

72 Inventor/es:

FOSTER, TIMOTHY;
HIGGINS, JUDY;
JOSEFSSON, ELISABET;
GEOGHEGAN, JOAN y
TARKOWSKI, ANDREJ

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 599 953 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de infecciones microbianas

5 INTRODUCCIÓN

La presente invención se refiere a vacunas de antígenos microbianos mejoradas, composiciones farmacéuticas, composiciones inmunógenas y anticuerpos y a su uso en el tratamiento de infecciones microbianas, especialmente las de origen bacteriano, incluido el origen estafilocócico.

10

La resistencia a múltiples fármacos (RMF) es un problema creciente entre bacterias grampositivas, especialmente en hospitales. El uso extendido de antibióticos y otros agentes para tratar infecciones bacterianas ha conducido al rápido desarrollo de bacterias resistentes a los agentes que tienen resistencia a múltiples fármacos. Así, existe actualmente la necesidad de proporcionar terapias mejoradas para tratar con dichas infecciones resistentes a los

15

fármacos. Los estafilococos son bacterias grampositivas de forma esférica, normalmente dispuestas como grupos irregulares a modo de racimos. Algunos son miembros de la flora normal de la piel y las membranas mucosas de los seres humanos, otros provocan supuración, formación de abscesos, diversas infecciones piógenas e incluso septicemia

20

letal. Los estafilococos patógenos a menudo hemolizan la sangre, coagulan el plasma y producen diversas enzimas y toxinas extracelulares. El género *Staphylococcus* tiene al menos 30 especies. Las tres especies principales de importancia clínica son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*. *Staphylococcus aureus* es

25

30

35

positivo a la coagulasa, lo que le diferencia de las otras especies. *S. aureus* es un patógeno importante en seres humanos. Casi todas las personas tienen algún tipo de infección por *S. aureus* durante su vida, con gravedad variable desde la intoxicación alimentaria o infecciones cutáneas menores a infecciones graves que amenazan la vida. Los estafilococos negativos a la coagulasa forman parte de la flora humana normal y a veces provocan infección, asociada a menudo con dispositivos implantados, especialmente en pacientes muy jóvenes, ancianos e

40

45

50

inmunodeprimidos. Aproximadamente el 75% de las infecciones causadas por estafilococos negativos a la coagulasa se deben a *S. epidermidis*. Las infecciones debidas a *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hominis* y otras especies son menos comunes. *S. saprophyticus* es una causa relativamente común de infecciones de las vías urinarias en mujeres jóvenes. Los estafilococos producen catalasa, que los diferencia de los estreptococos. *S. lugdunensis* también es relevante en la clínica y está presente en aproximadamente el 5 al 10% de los casos de endocarditis infecciosa.

La colonización por *S. aureus* del cartílago articular, del cual el colágeno es un componente principal, dentro del espacio articular parece ser un factor importante que contribuye al desarrollo de artritis séptica. La artritis bacteriana adquirida por vía hematógena se mantiene como un problema médico grave. Esta enfermedad de las articulaciones rápidamente progresiva y altamente destructiva es difícil de erradicar. Normalmente, menos del 50% de los pacientes infectados no consiguen recuperarse sin una lesión articular grave. *S. aureus* es el patógeno predominante aislado de pacientes adultos con osteomielitis hematógena y secundaria.

55

En pacientes hospitalizados, las bacterias de *Staphylococcus* tales como *S. aureus* son una causa principal de infección. Las infecciones localizadas iniciales de heridas o dispositivos médicos integrados pueden conducir a infecciones invasivas más grandes como septicemia, osteomielitis, mastitis y endocarditis. En infecciones asociadas con dispositivos médicos, las superficies de plástico y metal se recubren de plasma y proteínas de matriz del hospedador tales como fibrinógeno y fibronectina poco después de la implantación. Esta capacidad de *S. aureus* y otras bacterias estafilocócicas de adherirse a estas proteínas es esencial para el inicio de la infección. Los injertos vasculares, los catéteres intravenosos, las válvulas cardíacas artificiales y los dispositivos de asistencia cardíaca son trombólitos y proclives a la colonización bacteriana. De las bacterias estafilocócicas, *S. aureus* es generalmente el patógeno más perjudicial para dichas infecciones.

En hospitales de todo el mundo se ha observado un aumento importante en aislados de *S. aureus* que muestran resistencia a la mayor parte de los antibióticos disponibles en la actualidad para tratar infecciones. El desarrollo de la penicilina para combatir a *S. aureus* fue un avance trascendental en el control y el tratamiento de infecciones. Por desgracia, rápidamente aparecieron organismos resistentes a la penicilina y se hizo fundamental desarrollar nuevos antibióticos. Con la introducción de cada nuevo antibiótico, *S. aureus* ha podido ser contrarrestado con β -lactamasas, proteínas de unión a la penicilina alteradas y proteínas de membrana de células mutadas que permiten

la persistencia de la bacteria. En consecuencia, han aparecido *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) y organismos resistentes a múltiples fármacos y se han establecido con fuerza en hospitales y residencias de la tercera edad de todo el mundo (Chambers, H.F., Clin Microbiol Rev, 1:173, 1988; y Mulligan, M.E., y col., Am J Med, 94:313, 1993). Hoy en día, casi la mitad de las cepas estafilocócicas que provocan infecciones nosocomiales son resistentes a todos los antibióticos excepto la vancomicina, y al parecer es sólo cuestión de tiempo antes de que también la vancomicina pase a ser ineficaz.

Así, sigue existiendo una necesidad muy acusada y en rápido crecimiento de terapias para tratar infecciones por estafilococos tales como *S. aureus* que sean efectivas contra cepas resistentes a antibióticos de las bacterias.

10

En patógenos grampositivos, como estafilococos, estreptococos y enterococos, unas proteínas, llamadas adhesinas, median en dichas infecciones, por ejemplo promoviendo la colonización, la fijación a coágulos sanguíneos y tejido traumatizado. Estas adhesinas de superficie microbianas específicas reciben el nombre de MSCRAMM (moléculas de matriz adhesivas que reconocen componentes de superficies microbianas) (Patti, J., y col., Ann Rev Microbiol, 48:585-617, 1994; Patti, J. y Hook, M., Cur Opin Cell Biol., 6:752-758, 1994). Las MSCRAMM reconocen y se unen específicamente a componentes de la matriz extracelular (MEC), como fibronectina, fibrinógeno, colágeno y elastina. Estas MSCRAMM están presentes en muchos patógenos grampositivos y sus secuencias de aminoácidos están relacionadas, tienen un diseño modular similar y una organización común de dominios de unión.

Las MSCRAMM en la superficie de las células bacterianas y los ligandos en el tejido del hospedador interactúan en una forma de llave y cerradura en la adherencia de bacterias en el hospedador. A menudo se necesita la adhesión para la supervivencia bacteriana y ayuda a las bacterias para eludir los mecanismos de defensa del hospedador y las pruebas de provocación de antibióticos. Una vez que las bacterias se han adherido con éxito y han colonizado los tejidos del hospedador, su fisiología se modifica drásticamente y se secretan componentes perjudiciales como toxinas y enzimas. Por otra parte, las bacterias adherentes producen a menudo una biopelícula y se hacen resistentes rápidamente al efecto destructivo de la mayor parte de los antibióticos.

Una bacteria puede expresar MSCRAMM que reconocen diversas proteínas de matriz. Los sitios de unión a ligandos en las MSCRAMM parecen estar definidos por tramos contiguos relativamente cortos de secuencias de aminoácidos (motivos). Dado que puede encontrarse un motivo similar en varias especies diferentes de bacterias, al parecer estos motivos funcionales están sujetos a la transferencia entre especies (Patti y Hook, Cur Opin Cell Biol, 6:752-758, 1994). Además, en ocasiones una única MSCRAMM puede unirse a varios ligandos MEC.

Las MSCRAMM pueden mediar en la infección al unirse a proteínas que incluyen fibrinógeno (Fg) y/o fibronectina (Fn), etc. El fibrinógeno y la fibronectina son proteínas presentes en el plasma sanguíneo que tienen un papel clave en la hemostasia y la coagulación.

El fibrinógeno está compuesto por seis cadenas de polipéptidos, dos cadenas A α , dos B β y dos cadenas γ . La parte C-terminal de la cadena γ es importante en términos biológicos e interactúa con la integrina de plaquetas durante la adherencia y agregación de plaquetas. A esta región se dirige también *Staphylococcus aureus* con el resultado de una aglutinación de células y una adherencia de tejidos dependiente de fibrinógeno.

Staphylococcus aureus tiene varias proteínas expresadas en superficie que estimulan la activación y agregación de plaquetas. Las proteínas MSCRAMM de *Staphylococcus aureus* incluyen pero no se limitan a las siguientes:

45

- Factor de aglutinación A (ClfA) de proteína de unión a fibrinógeno;
- Factor de aglutinación B (ClfB) de proteína de unión a fibrinógeno;
- Proteína de unión a fibrinógeno-fibronectina A (FnBPA);
- Proteína de unión a fibrinógeno-fibronectina B (FnBPB); y
- Proteínas de superficie de *S. aureus* SasA, SasG, SasK, etc.

La Tabla 1 mostrada a continuación recoge una selección de varias proteínas de superficie ancladas a la pared celular de *Staphylococcus aureus*.

55

TABLA 1

Proteína de superficie	aa ^a	Ligando(s) ^b	Motivo ^c	Sortasa ^d
Proteína A (Spa)	508	Inmunoglobulina, factor de von Willebrand, TNFR ^e	LPETG	A
Proteína de unión a fibronectina A (FnbpA)	1.018	Fibronectina, fibrinógeno, elastina	LPETG	A
Proteína de unión a fibronectina B (FnbpB)	914	Fibronectina, fibrinógeno, elastina	LPETG	A
Factor de aglutinación A (ClfA)	933	Fibrinógeno, factor de complemento I	LPDTG	A
Factor de aglutinación B (ClfB)	913	Fibrinógeno, citoqueratina 10	LPETG	A
Adhesión a colágeno (Cna)	1.183	Colágeno	LPKTG	A
SdrC	947	Desconocido	LPETG	A
SdrD	1.315	Desconocido	LPETG	A
SdrE	1.166	Desconocido	LPETG	A
Pls	1.637	Desconocido	LPDTG	A
SasA	2.261	Desconocido	LPDTG	A
SasB	937	Desconocido	LPDTG	A
SasC	2.186	Desconocido	LPNTG	A
SasD	241	Desconocido	LPAAG	A
SasE/IsdA	354	Hemo ^f	LPKTG	A
SasF	637	Desconocido	LPKAG	A
SasG/Aap	1.117	Desconocido ^g	LPKTG	A
SasH	308	Desconocido	LPKTG	A
SasI/HarA/IsdH	895	Haptoglobina	LPKTG	A
SasJ/IsdB	645	Hemoglobina, hemo	LPQTG	A
SasK	211	Desconocido	LPKTG	A
IsdC	227	Hemo	NPQTN	B

^a aa, longitud de proteínas en aminoácidos.

^b Componente(s) molecular(es) reconocido(s) y unido(s) por proteína.

^c Motivo de consenso reconocido por sortasa y presente en señal de clasificación de pared celular C-terminal.

^d Sortasa para la cual la proteína de superficie de pared celular es sustrato.

^e TNFR, receptor de factor de necrosis tumoral

^f se une también a proteínas en célula epitelial desescamada. Promueve la resistencia a lípidos bactericidas y lactoferrina

^g se une también a células epiteliales nasales desescamadas. Interviene en la formación de biopelícula.

Otras bacterias estafilocócicas expresan proteínas expresadas en superficie (MSCRAMM) que son similares a los factores de aglutinación o proteínas de unión enumerados anteriormente. Estos incluyen pero no se limitan a:

5

- SdrF, SdrG y SdrH de *S. epidermidis* donde se ha demostrado que SdrG/F se une a fibrinógeno y colágeno.

- Fbl de *Staphylococcus lugdunensis* es una proteína de unión a fibrinógeno. Fbl es un miembro de la familia Sdr, un grupo de proteínas de superficie celular estafilocócicas que contienen una región de repetición de serina-aspartato característica. El dominio de unión a fibrinógeno de Fbl ha sido cartografiado en 313 aminoácidos, y muestra el 62% de identidad a la región correspondiente en el factor de aglutinación A (ClfA) de *Staphylococcus aureus*.

10

Otras proteínas/adhesinas de unión a ligando incluyen proteínas Isd (determinantes de superficie regulados por hierro), que aunque no todos son MSCRAMM en sí (por ejemplo, IsdB y IsdH) promueven la adhesión de bacterias a componentes de la matriz extracelular y en la presente memoria descriptiva se refieren como "proteínas de tipo MSCRAMM". Se sabe que IsdA promueve la adhesión a células escamosas, y tiene una baja afinidad por fibrinógeno y fibronectina, con lo que técnicamente puede definirse como MSCRAMM.

15

El factor de aglutinación A (ClfA) fue la primera adhesina de *S. aureus* de unión a cadena γ de fibrinógeno identificada. La proteína de unión a fibronectina-fibrinógeno A (FnBPA) y la proteína de unión a fibrinógeno-fibronectina B (FnBPB) se reconocieron posteriormente como proteínas bifuncionales para las que se encontró que se unían al mismo segmento peptídico C-terminal en la cadena γ de Fg. ClfA y FnBP tienen características estructurales que son comunes a todas las proteínas ancladas a la pared celular expresadas en bacterias grampositivas, incluyendo ClfB.

20

El factor de aglutinación A (ClfA), por ejemplo, es una proteína situada en superficie de *Staphylococcus aureus*. ClfA es un factor de virulencia importante de *S. aureus*. Contribuye a la patogenia de artritis séptica y endocarditis. ClfA es el arquetipo de una familia de proteínas asociadas a superficie con similar organización estructural/modular, lo que incluye pero no se limita a ClfB, SdrD, SdrE, etc.

5

El ClfA contiene un dominio A N-terminal de 520 aminoácidos (la región de unión a fibrinógeno), que comprende tres subdominios N1, N2 y N3 plegados por separado. El dominio A se sigue por una región de repetición dipeptídica de serina-aspartato y una región que cubre la membrana y la pared celular, que contiene el motivo LPDTG para anclaje promovido por la sortasa en la pared celular. El ClfA está presente prácticamente en todas las cepas de *S. aureus*
 10 (Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O'Neill G, Day NPJ (2002) Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 70:4987-4996). Se une al extremo C de la cadena γ de fibrinógeno, y por tanto es capaz de inducir la aglutinación de bacterias en solución de fibrinógeno (McDevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, Bell E, Turner N, McEntire L, Foster T, Höök M (1997) Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* factor of clumping
 15 (ClfA) and fibrinogen. *Eur J Biochem* 247:416-424 y McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ (1994) Molecular characterization of the factor of clumping (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 11:237-248).

El análisis estructural en 3D de ClfA y las proteínas de unión a fibrinógeno relacionadas SdrG y ClfB ha revelado que el dominio A de unión a ligando en todas estas proteínas relacionadas está compuesto por tres subdominios N1, N2
 20 y N3, siendo los residuos 221-559 que corresponden a las Regiones N2-N3 los mínimos truncamientos que conservan la capacidad de unirse a fibrinógeno. Se ha encontrado que los residuos de aminoácidos 532 a 538 corresponden a la región peptídica de cerradura de ClfA. Cada subdominio comprende nueve cadenas β que forman un nuevo plegamiento de tipo IgG. El sitio de unión peptídica a cadena γ de fibrinógeno en estas proteínas está situado en un surco hidrófobo en la unión entre N2 y N3. Se ha encontrado que existe una importante semejanza
 25 estructural entre la estructura 3d de estas proteínas, que se debe a una o más de secuencias de aminoácidos relacionadas, un diseño modular similar y una organización común de los dominios de unión.

SdrC, SdrD, SdrE, FnBPA-A (las siete isoformas) y FnBPB-B (las siete isoformas) tienen una organización modular similar, con lo que usando modelización molecular PHYRE se esperaría que estas proteínas tuvieran la misma
 30 estructura 3D.

IsdA e IsdB no tienen el mismo tipo de estructura que las proteínas Clf o Sdr. Tienen un nuevo motivo denominado NEAT que interviene en la unión a ligando. Sin embargo, el motivo NEAT es similar a la estructura 3D de Clf o Sdr, ya que está compuesto por la intercalación de cadenas beta (plegamiento de intercalación beta que consiste en dos
 35 láminas beta antiparalelas de cinco cadenas) y es un miembro de la superfamilia Ig (Pilpa y col. "Solution Structure of the NEAT (NEAr Transported) Domain from IsdH/HarA: the Human Hemoglobin Receptor in *Staphylococcus aureus*" *J. Mol. Biol.* (2006) 360:435-447). La estructura 3D del motivo NEAT de IsdH ha sido resuelta y se han predicho los residuos en bucle 1 b-2.

40 La expresión de ClfA en *S. aureus* obstaculiza la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos (Palmqvist N, Patti JM, Tarkowski A, Josefsson E (2004) Expression of staphylococcal clumping factor A impedes macrophage phagocytosis. *Microb Infect* 6:188-195 y Higgins J, Loughman A, van Kessel KPM, van Strijp JAG, Foster TJ (2006) Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *FEMS Microbiol Lett* 258:290-296). En neutrófilos se debe a un mecanismo dependiente del fibrinógeno y a un mecanismo independiente
 45 del fibrinógeno. En cambio, las plaquetas son activadas por bacterias que expresan ClfA a través de su interacción con GPIIb/IIIa que conduce a agregación. Esto se lleva a cabo con la máxima eficiencia cuando está presente el fibrinógeno, pero existe también una vía independiente del fibrinógeno para la activación de plaquetas (Loughman A, Fitzgerald JR, Brennan MP, Higgins J, Downer R, Cox D, Foster TJ (2005). Roles of fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by *Staphylococcus aureus* clumping factor A. *Mol Microbiol* 57:804-818 y
 50 O'Brien L, Kerrigan SW, Kaw G., Hogan M., Penadés J., Litt D., Fitzgerald D.J., Foster T.J. & Cox D. (2002) Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Mol Microbiol* 44, 1033-1044).

ClfA es un factor de virulencia para la inducción de artritis séptica en ratones (Josefsson E., Hartford O., O'Brien L, Patti JM, Foster T (2001) Protection contra experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. *J Infect Dis* 184:1572-1580). Además, la eliminación de ClfA junto con otra proteína de unión a fibrinógeno ClfB protegía frente a inflamación sistémica en fases tempranas de la infección (Palmqvist N, Foster T, Fitzgerald R, Josefsson E, Tarkowski A (2005) Fibronectin-binding proteins and fibrinogen-binding clumping factors play distinct roles in staphylococcal arthritis and systemic inflammation. *J Inf Dis*

191:791-798).

La proteína de unión a fibrinógeno ClfA de *Staphylococcus aureus* ha sido aislada y caracterizada y es objeto, por ejemplo, de las patentes de EE.UU. nº 6.008.341 y 6.177.084.

5 ClfA y ClfB tienen una organización estructural (3D) idéntica y aproximadamente el 27% de identidad de aminoácidos. FnBPA tiene una identidad de aminoácidos de aproximadamente el 25% con ClfA.

En la actualidad no existen vacunas basadas en MSCRAMM aprobadas y en el mercado. Veronate[®], ClfA y SdrG de 10 direccionamiento intravenoso de globulina inmunitaria (IGIV) humana estafilocócica seleccionada por donante, tuvo un desempeño deficiente en ensayos clínicos en fase III y fue retirado de los ensayos. En la actualidad es objeto de reevaluación para determinar si es un tratamiento viable para infecciones estafilocócicas.

El documento WO-2005/116.064 está dirigido a FnBPA, que es una proteína de unión multifuncional de *S. aureus*. El 15 dominio A N-terminal de FnBPA se asemeja a ClfA y se ha encontrado que se une a fibrinógeno. Sin embargo. Los dominios BCD C-terminales de FnBPA se unen a fibronectina, con lo que FnBPA es una MSCRAMM bifuncional.

El documento WO-2005/116.064 se basa en el hallazgo de que en presencia de transglutaminasa, se forman uniones covalentes entre la FnBPA de adhesina bacteriana y la fibronectina proteínica del hospedador, lo que hace 20 la asociación mucho más fuerte y esencialmente irreversible. El fibrinógeno es un componente principal (~ 3 mg/ml) en la sangre donde actúa como objeto final de la cascada de la coagulación. La fibronectina es menos abundante, ~ 0,3 mg/ml o una molécula de Fn por cada 10-15 de fibrinógeno. No se cree que el fibrinógeno y la fibronectina se asocien en la sangre donde circulan independientemente.

25 De forma importante, el documento WO-2005/116.064 se refiere específicamente a reticulación covalente catalizada por el factor XIIIa. El documento WO-2005/116.064 aísla múltiples mutantes en una FnBPA recombinante donde residuos con cadenas laterales de carga positiva (es decir, sustratos de transglutaminasa) estaban alterados. Además, el documento WO-2005/116.064 se dirige a mutantes que poseen sólo propiedades de unión a fibronectina covalente alterada y no a fibrinógeno. Además, este documento no muestra experimentalmente si la unión de la 30 proteína mutante al ligando se reduce y no proporciona datos de soporte de inmunogenicidad.

Así, a la vista de la prevalencia de resistencia a múltiples fármacos en bacterias grampositivas y a la falta de terapias y vacunas exitosas para estas bacterias resistentes a múltiples fármacos, cualquier terapia alternativa que pueda 35 manejar dichas infecciones bacterianas sin usar antibióticos tendrá un valor importante.

Además, cualquier mejora en la eficacia con respecto a cualquiera de los tratamientos o vacunas conocidos tendrá especial importancia, especialmente en un entorno clínico.

Así, la presente invención está dirigida a proporcionar una terapia alternativa y mejorada para dicho tratamiento de 40 dichas infecciones bacterianas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto general de la invención, se proporciona un factor de aglutinación A (ClfA) 45 estafilocócico recombinante de acuerdo con SEQ ID NO. 1 o una secuencia con al menos el 85%, preferentemente al menos el 95% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO. 1 o un fragmento de la misma que comprende al menos los residuos de aminoácidos 221 a 531 de la región de unión a fibrinógeno (Región A), caracterizado por al menos una sustitución o delección de residuo de aminoácido en el residuo de aminoácido Ala254, Tyr256, Pro336, Tyr338, Ile387, Lys389, Glu526 y/o Val527 para producir una proteína de unión a 50 fibrinógeno recombinante con capacidad reducida o que carece de la capacidad de unirse de forma no covalente a fibrinógeno que estimula una mayor respuesta inmunitaria que la proteína ClfA natural, para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una vacuna que comprende un factor de 55 aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona una construcción de ácido nucleico, vector de expresión o célula hospedadora que expresa un factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica inmunógena que comprende un factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la presente memoria descriptiva, los términos "adhesina", "MSCRAMM" y "proteínas ancladas a la pared celular" se considerarán intercambiables y cubren todas las proteínas de unión a ligando de origen microbiano. Idealmente, estas proteínas se unen a fibrinógeno, hemo o hemoglobina, haptoglobina-hemoglobina, hemina, colágeno y otros de dichos ligandos. El término proteínas "de tipo MSCRAMM" pretende cubrir las proteínas o adhesinas que tienen secuencias de aminoácidos relacionadas, diseño modular similar y/u organización de dominios de unión común/similar a dichas proteínas MSCRAMM, tales como proteínas Isd. Idealmente, las proteínas de tipo MSCRAMM tienen una organización de dominios de unión/diseño modular similares. Además, las proteínas de tipo MSCRAMM pueden tener al menos el 50%, preferentemente el 60%, preferentemente el 75%, más preferentemente el 85%, más preferentemente todavía el 95%, aún más preferentemente el 99% o más de identidad de secuencias de aminoácidos con las proteínas MSCRAMM.

Se entenderá también que cualquiera de las identidades u homologías porcentuales a las que se hace referencia en la memoria descriptiva se determina usando procedimientos convencionales disponibles en la longitud entera/completa de la secuencia.

El término "microorganismo", "microbio", "microbiano" o similares incluye pero no se limita a organismos que incluyen bacterias, hongos, virus, levaduras y/o mohos.

El término "cantidad inmunológicamente efectiva" cubre aquellas cantidades que son capaces de estimular una respuesta de linfocitos B y/o linfocitos T.

De acuerdo con un primer aspecto general de la invención, se proporciona un factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención para su uso en el tratamiento de infecciones microbianas, tal como el tratamiento de sepsis, artritis séptica y/o endocarditis u otras enfermedades o estados patológicos similares. Dichas infecciones microbianas pueden estar causadas idealmente por estafilococos u otros microorganismos similares.

De acuerdo con una realización específica de este aspecto de la invención, el factor de aglutinación A (ClfA) recombinante de la invención tiene una capacidad reducida o ausente de unirse de forma no covalente a su ligando hospedador.

Así, se entenderá que el factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención puede tener una unión reducida con su ligando hospedador o puede evitarse la unión con su ligando hospedador.

De acuerdo con la invención, se postula que la unión no covalente que tiene lugar durante la unión, por anclaje-llave-cerradura (DLL), de la proteína de la invención a su ligando puede reducirse o impedirse. Se establece que la primera etapa en la unión de una MSCRAMM a su ligando implica una interacción no covalente por medio del modelo DLL. Se trata de las interacciones MSCRAMM no covalentes primarias con el ligando. Las fases finales en la unión a ligando a MSCRAMM implican interacciones covalentes. En esta realización específica, el factor de aglutinación A (ClfA) recombinante de la invención tiene una capacidad reducida o ausente de unirse de forma no covalente a su ligando hospedador debido a la alteración del anclaje-llave-cerradura. Pueden alterarse una o más de las etapas de anclaje, llave o cerradura.

El modelo DLL se obtuvo a partir de la estructura 3D de SdrG en complejo con su ligando. ClfA ha demostrado que actúa por una variación menor del mecanismo DLL (Ganech y col. (2008) "A structural model of the Staphylococcus aureus ClfA-fibrinogen interaction opens new avenues for the design of anti-staphylococcal therapeutics". PLoS Pathog 4(11); e1000226). El modelo DLL se refiere específicamente a las interacciones no covalentes que intervienen en la unión a ligandos. El modelo DLL se infiere para todas las demás proteínas de tipo estructural similar (ya sea por semejanza/homología de aminoácidos u homología de organización estructural), lo que incluye pero no se limita a MSCRAMM o proteínas de tipo MSCRAMM.

En relación con ClfA/ClfB de MSCRAMM en particular, se ha encontrado que el dominio unión a ligando mínimo comprende las subregiones N1 a N3 de la Región A, específicamente las subregiones N2 y N3 que comprenden una variante de plegamiento de Ig Dev-IgG. La variante de plegamiento de Ig Dev-IgG es la nueva variante del motivo de

inmunoglobulina también denominado variante DE. Se postula que una bolsa hidrófoba formada entre los dos dominios DEv-IgG de ClfA/B es el sitio de unión a ligando para la cadena γ de fibrinógeno. Esencialmente, el ligando se une al surco hidrófobo que separa N2 y N3. Específicamente, durante la unión a ligando el componente peptídico no plegado del ligando se inserta en el surco situado entre los subdominios N2 y N3. El péptido de cerradura en el extremo C del subdominio N3 experimenta un cambio conformacional y se inserta entre dos cadenas beta en el subdominio N2, bloqueando así el ligando en su lugar. De hecho, la sustitución mutágena de residuos Tyr256, Pro336, Tyr338 y Lys389 en el factor de aglutinación, que se proponen para el contacto con los residuos terminales ⁴⁰⁸AGDV⁴¹¹ de la cadena γ de fibrinógeno, produjeron proteínas con afinidad marcadamente reducida o inexistente por fibrinógeno. Más adelante se ofrecen detalles adicionales de esta realización específica.

10

Así, con el fin de proporcionar el factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención, con unión reducida al ligando hospedador, puede alterarse la proteína de longitud completa, el dominio de unión a ligando, el dominio de unión a ligando mínimo o un fragmento de los mismos para reducir o evitar la unión a su ligando hospedador. Idealmente, para ClfA, las subregiones N2 y N3 de la Región A, que comprenden idealmente una variante de plegamiento Ig Dev-IgG, pueden modificarse para evitar o reducir la unión a su ligando hospedador. Dicha alteración se diseña para evitar la unión a ligando en el surco hidrófobo que separa los dominios de unión a ligando mínimos necesarios para DLL.

15

Dichas alteraciones en el dominio de unión a ligando pueden tener lugar en el nivel de los aminoácidos, por sustitución o delección de aminoácidos, usando proteína de longitud completa, dominio de unión a ligando, dominio de unión a ligando mínimo o un fragmento de los mismos. Se entenderá que pueden usarse también proteínas o fragmentos de las mismas con una homología suficientemente alta con la proteína de unión a ligando. La alta homología tal como se define en la presente memoria descriptiva tiene lugar cuando al menos el 50%, preferentemente el 60%, preferentemente el 70%, preferentemente el 80%, más preferentemente el 90%, más preferentemente todavía el 95%, más preferentemente aún del 95% al 99%, todavía más preferentemente del 99% o más de los nucleótidos se corresponden en toda la longitud de la secuencia de ADN o cuando se usan en conjunto con secuencias de aminoácidos cuando las secuencias de aminoácidos no son idénticas pero producen una proteína que tiene la misma funcionalidad y actividad. Se entenderá que estas observaciones acerca de la alta homología pueden relacionarse también con la estructura 3D de la proteína, es decir, la organización modular de los dominios de unión.

20

Se entenderá que puede usarse la proteína de unión a ligando completa, el dominio de unión a ligando, el dominio de unión a ligando mínimo o un fragmento de los mismos.

25

El uso de proteínas truncadas de la proteína de unión a ligando tal como el dominio de unión a ligando, el dominio de unión a ligando mínimo o el uso de fragmentos de los mismos es ventajoso para facilitar la fabricación y superar otros problemas como la escisión no deseada de la proteína. Por ejemplo, el péptido de cerradura, presente en el dominio de unión a ligando mínimo, puede suprimirse/eliminarse o alterarse. Por ejemplo, el péptido de cerradura en ClfA corresponde a los aminoácidos 532 a 538 de la Región A. Estos residuos pueden ser alterados, sustituidos o eliminados/suprimidos con el fin de impedir la unión a ligando en la MSCRAMM por medio de DLL. De esta forma se impide la "cerradura" de DLL de la MSCRAMM con su ligando. Esta "cerradura" tiene lugar por medio de una interacción no covalente. En una realización, el péptido de cerradura se elimina completamente junto con los residuos de aminoácidos en el extremo C de la Región A restantes. De acuerdo con otra realización, se elimina sólo la región del péptido de cerradura. De acuerdo con otra realización más, la región del péptido de cerradura experimenta sustitución de aminoácidos para producir la reducción o prevención de unión a ligando/cerradura. Estas observaciones son aplicables a todas las MSCRAMM o proteínas de tipo MSCRAMM con ligandos de unión mediante el modelo DLL u otros similares.

30

35

Al modificar el factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención de esta manera, es posible proporcionar una proteína de unión a ligando sin la capacidad de unirse con su ligando, lo que estimula una mayor respuesta inmunitaria en la inmunización que la proteína natural. Ventajosamente, así se reduce la inflamación sistémica, con lo que disminuye la virulencia microbiana. En consecuencia, esta proteína de unión a ligando alterada que carece de la capacidad de unirse con su ligando puede usarse ventajosamente en el tratamiento de infecciones microbianas. Así, estos hallazgos presentan una terapéutica de vacuna/inmunización nueva y valiosa frente a infecciones bacterianas que proporciona mejores resultados que una terapéutica de vacuna o inmunización derivada de la proteína natural.

40

45

En la presente memoria descriptiva se divulga también un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo y/o tratar a un paciente que tiene una infección microbiana, que comprende la administración al

individuo de un factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención, o una vacuna que comprende la proteína MSCRAMM o semejante a MSCRAMM estafilocócica recombinante, o un fragmento de la misma con unión reducida a su ligando hospedador.

- 5 De acuerdo con otra realización de este aspecto de la invención, se proporciona una vacuna que comprende un factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención, con unión reducida a su ligando hospedador.

En la presente memoria descriptiva se divulga también un anticuerpo preparado contra un factor de aglutinación A
10 (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención, preferentemente en la forma de un suero hiperinmune

De acuerdo con otra realización de este aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica inmunógena que comprende un factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención, con unión reducida a su ligando hospedador

15

De acuerdo con una realización preferida de la invención, se proporciona un factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención que comprende al menos la parte de región de unión a fibrinógeno, sin la capacidad de unirse a fibrinógeno para su uso en terapia.

- 20 Se entenderá que el factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención puede usarse en el tratamiento de infecciones estafilocócicas como en el tratamiento de sepsis, artritis séptica y/o endocarditis u otras enfermedades o estados patológicos similares.

La región de unión a fibrinógeno de la proteína se modifica de manera que deje de estar unida a fibrinógeno. Tal
25 como se indicó anteriormente, la alteración puede tener lugar en el nivel de nucleótidos o aminoácidos. Se entenderá que pueden usarse también proteínas o fragmentos de las mismas con homología suficientemente alta con la proteína de unión a fibrinógeno. La homología alta tal como se define en la presente memoria descriptiva tiene lugar cuando al menos el 50%, preferentemente el 60%, preferentemente el 70%, preferentemente el 80%, más preferentemente el 90%, más preferentemente todavía el 95%, aún más preferentemente del 95% al 99%, más
30 preferentemente todavía el 99% de los nucleótidos se corresponden en toda la longitud de la cadena de ADN o cuando se usa en relación con secuencias de aminoácidos cuando las secuencias de aminoácidos no son idénticas pero producen una proteína que tiene la misma funcionalidad y actividad. Se entenderá que estas observaciones acerca de la alta homología pueden relacionarse también con la estructura 3D de la proteína.

- 35 Se entenderá que pueden usarse la proteína de unión a fibrinógeno, la región de unión a fibrinógeno, la región de unión a fibrinógeno mínima, o un fragmento las mismas completas. El uso de proteínas truncadas o fragmentos de las mismas es ventajoso por facilidad de fabricación y para superar otros problemas tales como la escisión no deseada de la proteína. Se ampliará este concepto más adelante.

40 Dichos fragmentos deben comprender idealmente al menos parte de la región de unión a fibrinógeno de la proteína. Las ventajas de usar una proteína truncada o un fragmento de la misma, que comprende por ejemplo sólo uno o más subdominios de la región de unión a ligando-fibrinógeno, están relacionadas con la capacidad de purificar la proteína con alto rendimiento sin degradación. La región de unión a fibrinógeno de proteína ClfA, referida además como Región A, comprende 3 subregiones, N1, N2 y N3. Así, el fragmento inmunógeno puede comprender
45 subregiones N1, N2 y/o N3 de la Región A de ClfA o un fragmento de la misma. Así, por ejemplo, en relación con ClfA, el fragmento puede comprender uno o más subdominios de la Región A, N1, N2 o N3. Idealmente, pueden usarse N2 y N3 ya que este truncamiento es menos probable que sufra proteólisis (se ha indicado la existencia un sitio de escisión de proteasa entre N1 y N2 en ClfA y ClfB) y puede expresarse en niveles más elevados en *E. coli*. N2 y N3 son la región de unión a fibrinógeno mínima de las proteínas Clf.

50

Los autores de la invención han encontrado inesperadamente que esta proteína de unión a fibrinógeno alterada, truncamiento o fragmento de la misma, sin la capacidad de unirse a fibrinógeno estimula una mayor respuesta inmunitaria tras inmunización que la proteína natural que se une a fibrinógeno de la forma normal. Ventajosamente, esta proteína de unión a fibrinógeno alterada no provoca inflamación sistémica cuando es expresada por *S. aureus*,
55 y así se reduce la virulencia microbiana. En consecuencia, esta proteína alterada que carece de la capacidad de unirse a fibrinógeno puede usarse ventajosamente en el tratamiento de infecciones microbianas. Los autores de la invención han encontrado también al contrario de lo esperado que el efecto de protección de la proteína de unión a fibrinógeno alterada es mayor que la proteína natural. Los autores de la invención han encontrado que una composición farmacéutica o vacuna que comprende dicha proteína recombinante alterada es más efectiva que una

composición farmacéutica o vacuna que comprende la misma proteína recombinante en una forma no alterada (natural), tal como ClfA, ClfB, SdrG, etc.

Así, estos hallazgos presentan una terapéutica de vacuna/inmunización nueva y valiosa contra infecciones bacterianas que proporciona mejores resultados que la proteína natural cuando se usa también como terapéutica de vacuna/inmunización.

Se entenderá que la proteína alterada puede usarse en la generación de anticuerpos, incluyendo anticuerpos humanizados monoclonales, policlonales o quiméricos o fragmentos de los mismos, para su uso en el tratamiento de dichas infecciones microbianas. A continuación pueden proporcionarse composiciones que incluyen dichos anticuerpos, tales como suero hiperinmune, y estas composiciones pueden usarse en el tratamiento de pacientes infectados con infecciones por *Staphylococcus*.

Así, las proteínas o fragmentos activos de las mismas pueden usarse para inhibir la unión de estafilococos a la matriz extracelular (MEC) y para prevenir/tratar infecciones estafilocócicas en un paciente.

Además, las proteínas o fragmentos activos de las mismas, y los anticuerpos de las proteínas son útiles en el tratamiento de infecciones por infecciones estafilocócicas, para el desarrollo de vacunas para vacunación activa o pasiva, y cuando se administran como una composición farmacéutica en una herida o un dispositivo médico, tanto las proteínas como los anticuerpos son útiles como agentes de bloqueo para prevenir la infección microbiana. Por ejemplo, estas proteínas o fragmentos de las mismas pueden usarse en vacunas activas, y los anticuerpos para estas proteínas en vacunas pasivas.

Estas vacunas y productos descritos en la presente memoria descriptiva presentan una mejora importante con respecto a la técnica anterior, que enseña el uso general de MSCRAMM para impartir inmunización, pero no enseña las vacunas o productos inesperados o mejorados descritos en la presente memoria descriptiva.

La preparación de proteínas, ADN y anticuerpos son bien conocidos en la técnica y no se describirán en detalle en la presente memoria descriptiva. Las técnicas convencionales se usan idealmente en la generación de estas moléculas. Se entenderá también que la invención cubre la construcción de ácidos nucleicos que contienen la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos de interés, las células hospedadoras recombinantes que contienen dicha construcción de ácidos nucleicos para expresar la proteína de interés y las composiciones inmunógenas.

Para la administración, la composición de proteínas puede dispersarse en una solución salina isotónica estéril u otro adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Se entenderá que la vacuna puede ser una vacuna de ADN o de proteína.

La inmunización puede tener lugar mediante la inyección de ADN, proteína o anticuerpos. Alternativamente, puede administrarse un organismo vivo atenuado que incluye y expresa el ADN.

La cantidad de ADN, proteína o anticuerpos que puede administrarse dependerá de varios factores mitigantes, que incluyen dependencia de la fuerza del promotor, la expresión de proteína y la inmunogenicidad del gen expresado. Estos factores pueden verse alterados para cada nueva aplicación con el fin de obtener la cantidad inmunológicamente efectiva deseada requerida.

En la presente memoria descriptiva se divulga también un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo y/o para tratar a un paciente que tiene una infección microbiana, que comprende la administración al individuo de un factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención que comprende al menos la región de unión a fibrinógeno, sin la capacidad de unirse a fibrinógeno.

De acuerdo con una realización preferida adicional de la invención, se proporciona una vacuna que comprende un factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención que comprende al menos parte de la región de unión a fibrinógeno, sin la capacidad de unirse a fibrinógeno.

En la presente memoria descriptiva se divulga también un anticuerpo preparado contra un factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención que comprende al menos parte de la región de unión a fibrinógeno, sin la capacidad de unirse a fibrinógeno, preferentemente en la forma de un suero hiperinmune.

De acuerdo con una realización preferida adicional más de la invención, se proporciona una composición farmacéutica inmunógena que comprende un factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de la invención que comprende al menos parte de la región de unión a fibrinógeno, sin la capacidad de unirse a fibrinógeno y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

5

Idealmente, la proteína de unión a fibrinógeno estafilocócica recombinante o un fragmento de la misma se obtiene de *S. aureus*, *S. epidermidis* y/o *S. lugdunensis*.

Se entenderá que las sustituciones o deleciones de nucleótidos o aminoácidos en la región de unión a fibrinógeno de dicha proteína de unión a fibrinógenos producen una proteína recombinante sin la capacidad de unirse a fibrinógeno.

Se ha determinado que la unión a ClfA-fibrinógeno tiene lugar mediante un mecanismo de anclaje-llave-cerradura (DLL) similar al de SdrG. El modelo DLL se explicó en extenso anteriormente. La Región A de ClfA es responsable de la interacción proteína-ligando. Tal como se muestra en la Figura 11, la estructura modular de varias MSCRAMM de unión a fibrinógeno es similar y todas ellas contienen una Región A similar a ClfA.

15

El sitio de unión a péptido de cadena γ de fibrinógeno está situado en un surco hidrófobo en la unión entre N2 y N3 de ClfA. Así, las sustituciones o deleciones mencionadas anteriormente se designan de manera que modifiquen la interacción proteína-ligando de MSCRAMM e impidan la unión no covalente de ClfA a fibrinógeno.

20

De acuerdo con una realización específica de la presente invención, la proteína de unión a fibrinógeno estafilocócica recombinante es un mutante deficiente de unión a fibrinógeno de ClfA. En esta realización, la Región de unión a fibrinógeno A de ClfA es modificada por cualquier medio (tal como mutaciones de sustitución o deleción) de manera que deje de estar unida a fibrinógeno.

25

Idealmente, la proteína de unión a fibrinógeno es ClfA, sin embargo, ClfA contiene una semejanza estructural 3D con muchas otras proteínas de unión a fibrinógeno.

ClfA es una proteína de 993 aminoácidos, que comprende un dominio de unión a fibrinógeno de 520 aminoácidos (de los aminoácidos 40 a 559). Este dominio de unión a fibrinógeno es el dominio A en el extremo N que comprende las subregiones N1, N2 y N3. En la invención puede usarse la región de fibrinógeno completa que cubre de N1 a N3 desde el aminoácido 40 al aminoácido 559. Alternativamente, puede usarse un truncamiento de la región N1 a N3, por ejemplo de 221 a 559 (la región de unión a fibrinógeno mínima), de 221 a 531 (la región de fibrinógeno mínima sin el péptido de cerradura y los residuos posteriores), etc. Idealmente, pueden usarse las subregiones N2 y N3, la región de unión a fibrinógeno mínima, que corresponden a los residuos de aminoácidos 221 a 559. Alternativamente, puede usarse un fragmento de estas subregiones.

30

35

Se ha establecido que los residuos de aminoácidos 221 a 559, que cubren las regiones N2 y N3, de ClfA desempeñan una parte importante en la unión a fibrinógeno y son la región de unión a fibrinógeno mínima. Los autores de la invención han encontrado también inesperadamente que la mutación de residuos de aminoácidos en esta región produce una proteína expresada que puede ser reconocida por las defensas inmunitarias del hospedador pero carece de unión a fibrinógeno y, con ello, reduce la virulencia asociada. Esta región (el dominio de unión a fibrinógeno de 339 aminoácidos) de ClfA tiene una estructura 3D específica, denominada plegamiento IgG variante DE, y es el truncamiento de unión a Fg mínimo que si se altera (por medio de sustitución o deleción, etc.) puede proporcionar una terapia mejorada.

40

45

50

La alteración para producir la pérdida de actividad de unión a fibrinógeno puede tener lugar por sustitución, adición o inserción o deleción en el nivel de nucleótidos o de aminoácidos. Idealmente, la sustitución influye negativamente en la estructura 3D (por ejemplo del denominado plegamiento IgG variante DE) de la proteína o fragmento con lo que ya no puede unirse a fibrinógeno.

50

Idealmente, la sustitución de nucleótidos o aminoácidos reduce la interacción no covalente con fibrinógeno, preferentemente impidiendo la unión a ligando a la bolsa hidrófoba que separa N2 y N3 de la Región A de la proteína de unión a fibrinógeno. Alternativamente, la región del péptido de cerradura que corresponde a los aminoácidos 532 a 538 puede modificarse por sustitución o deleción para impedir la unión a ligando. Además, puede usarse un truncamiento/fragmento que carece de la región del péptido de cerradura y opcionalmente el resto de los residuos de proteínas en el extremo C, es decir, que carece de los residuos de aminoácidos 532 a 559.

55

De acuerdo con una realización específica de este aspecto de la invención, el mutante de ClfA deficiente en unión a

fibrinógeno puede construirse intercambiando los aminoácidos P₃₃₈ por serina y/o Y₃₃₈ por aspartato, respectivamente. La elección de los residuos se basó en la estructura cristalina en rayos X de ClfA y en la observación de que los cambios individuales en la prolina o la tirosina redujeron la afinidad de unión. Sorprendentemente, los autores de la invención encontraron que esta proteína ClfA mutante (rClfAP₃₃₈S Y₃₃₈A) 5 estimulaba una respuesta inmunitaria y puede usarse en la generación de una terapia mucho más efectiva de vacunas o anticuerpos. Esta sustitución puede tener lugar en la proteína de longitud completa de unión a fibrinógeno, la región de unión a fibrinógeno, la región de unión a fibrinógeno mínima o un fragmento de las mismas.

De acuerdo con otra realización específica de este aspecto de la invención, el mutante deficiente en unión a 10 fibrinógeno de ClfA puede construirse intercambiando aminoácidos P₃₃₆ por aspartato y/o Y₃₃₈ por serina, respectivamente. Como en la realización anterior, esta proteína ClfA mutante (rClfAP₃₃₆A Y₃₃₈S) puede usarse también en la generación de una terapia mucho más efectiva de vacunas o anticuerpos.

Alternativamente, la alteración puede estar en la forma de a delección, que comprende la región de unión a 15 fibrinógeno sin la secuencia de péptidos de cerradura (aminoácidos 532 a 538), para producir una proteína de unión a fibrinógeno recombinante sin la capacidad de unirse de forma no covalente a fibrinógeno. En esta realización, se usan residuos de aminoácidos 221 a 531 de Región A de ClfA, que carecen del péptido de cerradura y de los residuos siguientes del extremo C. Alternativamente, puede contemplarse una sustitución de aminoácidos en los aminoácidos de péptidos de cerradura 532 a 538 que impide el DLL del fibrinógeno.

20 Debe entenderse que todas las proteínas en la familia Clf-Sdr se unen a ligandos mediante el modelo DLL. Al modelizar la estructura 3D, es posible predecir el péptido de cerradura y preparar un truncamiento que carezca de él, ya sea en la longitud completa (N1 a N3) o en el truncamiento de unión a ligando mínimo N2-N3, o un fragmento de los mismos.

25 Los autores de la invención encontraron que estas proteínas rClfA de sustitución (ya sean mutantes de delección, sustituciones o truncamientos) redujeron la virulencia y el resultado de la enfermedad, y sorprendentemente indujeron menos inflamación sistémica que la proteína natural.

30 Así, se espera que la inmunización con estas proteínas mutantes, basándose en las proteínas sometidas a ensayo, potencie el nivel de anticuerpos que reconocieron tanto la proteína mutante como la natural y proporcione una mayor respuesta inmunitaria que la proteína natural.

35 Así, la ClfA que ha sido alterada de manera que deje de unirse a fibrinógeno es un candidato terapéutico útil para inmunización activa o pasiva. De esta forma, la proteína ClfA alterada en sí puede usarse como una vacuna o pueden usarse anticuerpos preparados para esta proteína ClfA alterada. Como antes la vacuna puede ser una vacuna de ADN o de proteína.

Pueden usarse las siguientes secuencias incluidas en la tabla mostrada a continuación de acuerdo con la invención.

40

SEQ ID NO	Descripción	Longitud	Región A
1	rClfA natural - secuencia aa longitud completa (Ejemplo 1)	933 aa	-
2	Región A rClfA natural - secuencia ADN longitud completa (Ejemplo 1)	1560 nucleótidos	N1 a N3
3	Región A rClfA natural - secuencia aa longitud completa (Ejemplo 1)	520 aa	N1 a N3
4	Región A rClfAPYI (Ejemplo 1)	520 aa	N1 a N3
5	Región A rClfAPYII (Ejemplo 1)	520aa	N1 a N3
6	Región A rClfA natural - secuencia aa longitud completa con residuos en terminales N y C adicionales ¹ (Ejemplo 2)	530aa	N1 a N3
7	Región A rClfAPYI con residuos en terminales N y C adicionales ¹ (Ejemplo 1)	530aa	N1 a N3
8	Región A rClfAPYII con residuos en terminales N y C adicionales	530aa	N1 a N3
9	rClfA 221-559 (Ejemplo 2)	339 aa	N2 y N3
10	rClfA 221-559 con residuos en terminales N y C adicionales ¹ (Ejemplo 2)	349 aa	N2 y N3
11	PY rClfA 221-559 (Ejemplo 2)	339aa	N2 y N3
12	PY rClfA 221-559 con residuos en terminales N y C adicionales ¹ (Ejemplo 2)	349aa	N2 y N3
13	rClfA 221-531 (truncamiento cerradura delta) con residuos en terminales	321aa	N2 y N3 ³

	N y C adicionales ² (Ejemplo 2)		
14	rClfAPY 221-531 (truncamiento cerradura delta)	311 aa	N2 y N3 ³
<p>¹ Los residuos adicionales en el extremo N (extensión en extremo N (6 x His tag y residuos adicionales) comprenden 6 residuos His, seguido por Gly y Ser. Los residuos adicionales en el extremo C comprenden Lys seguido por Leu (pueden usarse otros residuos en terminales N y C adicionales, dependiendo del cebador usado o de las etiquetas requeridas en los extremos N/C)</p> <p>² Los residuos adicionales en el extremo N (6 x His tag y residuos adicionales) comprenden 6 residuos His, seguido por Gly y Ser. Los residuos adicionales en el extremo C comprenden Arg seguido por Ser (pueden usarse otros residuos en terminales N y C adicionales, dependiendo del cebador usado o de las etiquetas requeridas en los extremos N/C))</p> <p>³ sin el péptido de cerradura correspondiente a los residuos aa 532 a 538 y los residuos restantes en el extremo C de la Región A, es decir, que carece de residuos de aminoácidos 532 a 559.</p>			

Idealmente, la proteína de unión a fibrinógeno estafilocócica recombinante comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO. 1 a 3 donde los residuos P₃₃₆ y/o Y₃₃₈ están sustituidos por serina y/o alanina, o un fragmento de las mismas.

5

Alternativamente, el fragmento de la proteína de unión a fibrinógeno estafilocócica recombinante comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO. 4 a SEQ ID NO. 14. SEQ ID NO. 4 y 5 corresponden al dominio A de ClfA N1, N2, N3 sólo, rClfA P₃₃₆S Y₃₃₈A y rClfA P₃₃₆A Y₃₃₈S respectivamente tal como se indica en la tabla anterior.

10

Se postula también, basándose en las sustituciones en la cerradura que se prepararon en SdrG, que las sustituciones en la cerradura que son defectuosas en el cambio conformacional o la complementación de la cadena beta también serán defectuosas en unión a ligando. Así, idealmente, las sustituciones están en los residuos de aminoácidos 532 a 538 que corresponden al péptido de cerradura y afectan a la capacidad del péptido de experimentar un cambio conformacional, o se unen al ligando o ambos. Alternativamente, la alteración puede comprender la eliminación de los residuos de aminoácidos 532 a 538 (péptido de cerradura delta) al mismo tiempo, para proporcionar resultados similares. Además, un mutante de truncamiento en el extremo C que carece de residuos de aminoácidos 532 a 559 (incluidos residuos de péptido de cerradura) realizará también la unión al ligando.

20

Sin embargo, se contemplará también que podrían sustituirse residuos de aminoácidos distintos de los antes enumerados específicamente. Por ejemplo, pueden sustituirse Glu 526, Val 527, Tyr 256 y Lys 389 para alterar las propiedades de unión a fibrinógeno de la proteína o de un fragmento de la misma. Así, puede contemplarse cualquier sustitución que reduzca la capacidad de unión. Idealmente, dichas sustituciones o deleciones realizan la bolsa hidrófoba y el mecanismo asociado para unión al ligando en la distancia hidrófoba tales como los homólogos Val527 en ClfA y N526 en ClfB. En ClfB, se han estudiado Q235 y N526 para mostrar que reducen la unión. Se realizó un estudio similar con FnBPA donde N304 y F306 mostraron que eran importantes para la unión a Fg. Así, las mutaciones en estos residuos de aminoácidos afectarán a la unión a ligando.

25

30 El tratamiento (vacuna, anticuerpo o composición farmacéutica, etc.) puede comprender la región de unión a fibrinógeno completa o un fragmento de la misma.

En la memoria descriptiva, los términos "comprender, comprende, comprendido y que comprende" o cualquier variación de los mismos y los términos "incluir, incluye, incluido y que incluye" o cualquier variación de los mismos se consideran totalmente intercambiables y deben entenderse con la interpretación más extensa posible.

35

La invención no se limita a la realización descrita anteriormente, sino que puede modificarse en su construcción y en sus detalles dentro del alcance de las reivindicaciones.

40 A continuación se describirá la presente invención con referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitativos.

Las Figuras 1 a 15 muestran los resultados del Ejemplo 1.

La Figura 1 muestra la gravedad de la artritis (A), medida como índice artrítico, y la pérdida de peso (B) en ratones a los que se ha inoculado la cepa Newman de *S. aureus*, y se inocularon de *clfAPYI*, *clfAPYII* y *clfA* nula mutante. Se inoculó 3,2 x 10⁶ - 6,0 x 10⁶ UFC de cepas de *S. aureus*. Los datos se presentan como medianas (cuadrados o líneas centrales), intervalos intercuartílicos (cajas) e intervalos centrales del 80% (bigotes). Se agrupan los datos de

45

tres experimentos. $N_{\text{Newman}} = 27 - 30$, $N_{\text{clfAPYI}} = 30$, $N_{\text{clfAPYII}} = 10$ y $N_{\text{clfA}} = 16 - 20$.

La Figura 2 muestra el crecimiento bacteriano en los riñones de ratones 7-8 días después de la inoculación con $3,2 \times 10^6 - 6,0 \times 10^6$ UFC de cepa Newman de *S. aureus*, y *clfAPYI*, *clfAPYII* y *clfA* nula mutante. Los datos se presentan como UFC por par de riñones. Cuando no se detectó crecimiento, se asignó el máximo recuento posible de acuerdo con la dilución usada. Se agrupan los datos de tres experimentos.

$$N_{\text{Newman}} = 26, N_{\text{clfAPYI}} = 30, N_{\text{clfAPYII}} = 10 \text{ y } N_{\text{clfA}} = 15.$$

10 La Figura 3 muestra la supervivencia de ratones después de la inoculación con $5,2, 5,1$ ó $3,3 \times 10^7$ UFC de cepa Newman de *S. aureus*, *clfAPYI* mutante o *clfA* nula mutante, respectivamente. $N = 10$ por grupo desde el inicio.

La Figura 4 muestra la supervivencia de ratones después de la inoculación con $9,4, 7,9, 10,7$ ó $9,8 \times 10^6$ UFC de cepa LS-1 de *S. aureus* y *clfAPYI*, *clfAPYII* o *clfA* nula mutante, respectivamente. $N = 15$ por grupo desde el inicio.

15

La Figura 5 muestra la supervivencia de ratones inmunizados con BSA, ClfA recombinante o ClfAPY recombinante (es decir, dominio A de proteína ClfAPYI recombinante) y se les inoculó $2,3 \times 10^7$ UFC de Newman de *S. aureus*. $N = 15$ por grupo desde el inicio.

20 La Figura 6 muestra la frecuencia de ratones artríticos a los que se inoculó $3,2 \times 10^6 - 6,0 \times 10^6$ UFC de cepa Newman de *S. aureus* natural, y *clfAPYI*, *clfAPYII* y *clfA* nula mutante. Se agrupan los datos de tres experimentos. $N_{\text{Newman}} = 27 - 30$, $N_{\text{clfAPYI}} = 30$, $N_{\text{clfAPYII}} = 10$ y $N_{\text{clfA}} = 16 - 20$.

La Figura 7 muestra la gravedad de artritis medida como índice artrítico en ratones a los que se inoculó $5,2, 5,1$ ó $3,3 \times 10^7$ UFC de cepa Newman de *S. aureus* natural, *clfAPYI* mutante o *clfA* nula mutante, respectivamente. Los datos se presentan como medianas (cuadrados), intervalos intercuartílicos (cajas) e intervalos centrales del 80% (bigotes). $N_{\text{Newman}} = 0-10$, $N_{\text{clfAPYI}} = 9-10$ y $N_{\text{clfA}} = 0-10$.

La Figura 8 muestra la pérdida de peso en ratones a los que se inoculó $5,2, 5,1$ ó $3,3 \times 10^7$ UFC de cepa Newman de *S. aureus* natural, *clfAPYI* mutante o *clfA* nula mutante, respectivamente. Los datos se presentan como medianas (línea central), intervalos intercuartílicos (cajas) e intervalos centrales del 80% (bigotes). $N_{\text{Newman}} = 0-10$, $N_{\text{clfAPYI}} = 9-10$ y $N_{\text{clfA}} = 0-10$.

La Figura 9 muestra la gravedad de artritis medida como índice artrítico en ratones inmunizados con BSA, ClfA recombinante o ClfAPY recombinante (es decir, dominio A de proteína ClfAPYI recombinante) y se les inoculó $4,0 \times 10^8$ UFC de Newman de *S. aureus*. Los datos se presentan como medianas (cuadrados), intervalos intercuartílicos (cajas) e intervalos centrales del 80% (bigotes). $N_{\text{BSA}} = 14$, $N_{\text{clfAPY}} = 14$ y $N_{\text{clfA}} = 15$ por grupo desde el inicio.

La Figura 10 proporciona la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de proteína de dominio A de ClfA natural (rClfA), sólo los dominios N123, con los residuos resaltados que están modificados en los ejemplos siguientes (P₃₃₈ y Y₃₃₈) para dar lugar a rClfAPYI/II (SEQ ID NO: 3). Este dominio A de proteína recombinante se usó en la vacunación en los ejemplos siguientes.

La Figura 11 muestra una representación ilustrativa de la estructura de las proteínas FnBPA, ClfB, ClfA y SdrG. La Región A es la región de unión a fibrinógeno, S es la secuencia de señal, W es el dominio que cubre pared celular, M es el anclaje de membrana que incluye el motivo LPXTG, + representa residuos con carga positiva y R es la región de repetición. En ClfA la Región A comprende N123 (no mostrado). La región BCD de FnBPA (y la región CD más corta de FnBPB - no mostrada) se une a fibronectina.

La Figura 12 muestra las respuestas de anticuerpos específicos a ClfAPY recombinante 40-559 en muestras séricas de ratones inmunizados con albúmina de suero bovino (BSA), ClfA recombinante 40-559 (rClfA) o ClfAPY recombinante 40-559 (rClfAPY), 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo, que fue un día antes de la infección con $2,3 \times 10^7$ UFC/ratón de cepa Newman de *S. aureus* natural para inducción de sepsis. Los datos se presentan como medianas (líneas centrales), intervalos intercuartílicos (cajas) e intervalos centrales del 80% (bigotes). $N_{\text{BSA}} = 13-15$, $N_{\text{rClfA}} = 15$ y $N_{\text{rClfAPY}} = 15$.

La Figura 13 muestra las respuestas de anticuerpos específicos a ClfA recombinante 40-559 en muestras séricas de ratones inmunizados con albúmina de suero bovino (BSA), ClfA recombinante 40-559 (rClfA) o ClfAPY recombinante 40-559 (rClfAPY), 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo, que fue un día antes de la infección con

2,3 x 10⁷ UFC/ratón de cepa Newman de *S. aureus* natural para inducción de sepsis. Los datos se presentan como medianas (líneas centrales), intervalos intercuartílicos (cajas) e intervalos centrales del 80% (bigotes). $N_{BSA} = 13-15$, $N_{rClfA} = 15$ y $N_{rClfAPY} = 15$.

5 La Figura 14 muestra las respuestas de anticuerpos específicos a ClfAPY recombinante 40-559 en muestras séricas de ratones inmunizados con albúmina de suero bovino (BSA), ClfA recombinante 40-559 (rClfA) o ClfAPY recombinante 40-559 (rClfAPY), 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo, que fue un día antes de la infección con 4,0 x 10⁶ UFC/ratón de cepa Newman de *S. aureus* natural para inducción de artritis séptica. Los datos se presentan como medianas (líneas centrales), intervalos intercuartílicos (cajas) e intervalos centrales del 80% (bigotes). $N_{BSA} = 14-15$, $N_{rClfA} = 15$ y $N_{rClfAPY} = 15$.

15 La Figura 15 muestra las respuestas de anticuerpos específicos a ClfA recombinante 40-559 en muestras séricas de ratones inmunizados con albúmina de suero bovino (BSA), ClfA recombinante 40-559 (rClfA) o ClfAPY recombinante 40-559 (rClfAPY), 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo, que fue un día antes de la infección con 4,0 x 10⁸ UFC/ratón de cepa Newman de *S. aureus* natural para inducción de artritis séptica. Los datos se presentan como medianas (líneas centrales), intervalos intercuartílicos (cajas) e intervalos centrales del 80% (bigotes). $N_{BSA} = 14-15$, $N_{rClfA} = 15$ y $N_{rClfAPY} = 15$.

20 La Figura 16 del Ejemplo 2 muestra las respuestas de anticuerpos específicos a ClfAPY recombinante 221-559 en muestras séricas de ratones inmunizados con albúmina de suero bovino (BSA), ClfA recombinante 221-559 (rClfA221-559) o ClfAPY recombinante 221-559 (rClfAPY221-559), 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo. Los datos se presentan como medianas (líneas centrales), intervalos intercuartílicos (cajas) e intervalos centrales del 80% (bigotes). $N_{BSA} = 15$, $N_{rClfA221-559} = 14-15$ y $N_{rClfAPY221-559} = 14-15$.

25 La Figura 17 del Ejemplo 2 muestra las respuestas de anticuerpos específicos a ClfA recombinante 221-559 en muestras séricas de ratones inmunizados con albúmina de suero bovino (BSA), ClfA recombinante 221-559 (rClfA221-559) o ClfAPY recombinante 221-559 (rClfAPY221-559), 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo. Los datos se presentan como medianas (líneas centrales), intervalos intercuartílicos (cajas) e intervalos centrales del 80% (bigotes). $N_{BSA} = 15$, $N_{rClfA221-559} = 14-15$ y $N_{rClfAPY221-559} = 14-15$.

30 La Figura 18 del Ejemplo 3 muestra las respuestas de anticuerpos específicos a ClfA recombinante 221-531 en muestras séricas de ratones inmunizados con ClfAPY recombinante 221-531 (rClfAPY221-531), 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo. Los datos se presentan como medianas (líneas centrales), intervalos intercuartílicos (cajas) e intervalos centrales del 80% (bigotes). $N_{rClfA221-531} = 14-15$.

35 Ejemplos

Ejemplo 1

40 Truncamientos de la región A de rClfA que comprenden N1, N2 y N3 (aminoácidos 40-559)

MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS

45 Al final de esta sección se proporcionan detalles completos de las referencias numéricas entre paréntesis incluidas en los Ejemplos.

Ratones

50 Se obtuvieron ratones NMRI de Scanbur BK (Sollentuna, Suecia) y se mantuvieron en las instalaciones para animales del Departamento de Reumatología, Universidad de Gotemburgo, Suecia. Los experimentos fueron aprobados por el comité de ética de experimentos con animales de Gotemburgo. Se alojó a hasta 10 animales por jaula con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h, y se les alimentó con pienso estándar de laboratorio y agua a voluntad. Al inicio de los experimentos los animales tenían de 6 a 16 semanas de vida.

55 Cepas bacterianas

Para la infección de los animales se usaron cepas Newman de *S. aureus* naturales (14) y LS-1 (11) y se construyeron derivados de las mismas. Se construyeron derivados de ClfA P₃₃₆SY₃₃₈A (clfAPYI) y clfA P₃₃₆AY₃₃₈S (clfAPYII) en cepa Newman y se realizó transducción a cepa LS-1 (véase más adelante). Se usaron también los

mutantes de delección Newman *clfA2::Tn917* mutante DU5876 (3) y LS-1 *clfA2::Tn917* mutante (J.R. Fitzgerald y col., inédito). Las bacterias se cultivaron en placas de agar en sangre durante 48 h, se recogieron y se mantuvieron congeladas a -20°C en PBS que contenía el 5% (p/v) de BSA (Sigma Chemicals) y el 10% (v/v) de sulfóxido de dimetilo. Antes de la inyección en los animales, se descongelaron las suspensiones bacterianas, se lavaron en PBS 5 y se ajustaron a concentraciones celulares apropiadas. Se midió el número de bacterias viables en conjunción con cada prueba de provocación por cultivo en placas de agar en sangre y recuento de colonias.

Construcción de mutaciones de *clfAPYI* y *clfAPYII* en Newman y LS-1 de *S. aureus*

10 En este experimento, se usó un truncamiento de la región A de ClfA de longitud completa, que comprende N1, N2 y N3, correspondientes a los aminoácidos 40 a 559. En la descripción y las figuras siguientes:

- ClfA puede referirse también como rClfA 40-559 (SEQ ID NO 3);

15 - ClfA P₃₃₆SY₃₃₈A puede referirse también como *clfAPYI*, *rclfAPY* o *rclfAPYI* (es decir, *clfAPYI* 40-559) (SEQ ID NO 4); y

- ClfA P₃₃₆AY₃₃₈S puede referirse también como *clfAPYII*, *rclfAPYII* (es decir, *clfAPYII* 40-559) (SEQ ID NO 5).

20 Se clonaron 1,02 kb de fragmento *PstI-BamHI* de pCF77 PY (Loughman y col., 2005) que contenía las mutaciones P₃₃₆S y Y₃₃₈A en *clfA* en pBluescriptII SK- (Stratagene). Se linealizó este plásmido con *HindIII* y se ligó a *HindIII*-cut pT*SermC* (J. Higgins, inédito) para generar plásmido pARM, que es un vector transportador de *E. coli-S. aureus* sensible a la temperatura que contiene las sustituciones P₃₃₆S y Y₃₃₈A.

25 Con el fin de reducir el riesgo de generar sin saberlo un epítipo funcional o inmunorreactivo por sustitución de P₃₃₆ e Y₃₃₈, los autores de la invención generaron un segundo mutante, en el que se invirtió el orden de las sustituciones, para producir P₃₃₆A y Y₃₃₈S. Para generarlo se generó un plásmido pJH2, análogo a pARM pero que contenía las sustituciones P₃₃₆A y Y₃₃₈S. Se usó PCR de cebador de superposición con los mismos cebadores de flanqueo usados para preparar pCF77 PY (6), y un par diferente de cebadores mutágenos de superposición:

30 F3: GCAACTTTGACCATGGCCGCTTCTATTGACCCTGAAAATG y

R3: CATTTTCAGGGTCAATAGAAGCGGCCATGGTCAAAGTTGC

35 (mutaciones en negrita y subrayadas) para generar pCF77 PYII. El fragmento de 1,02 kb de *PstI-HindIII* de este plásmido se usó tal como se describe anteriormente para generar pJH2, un vector transportador de *E. coli-S. aureus* sensible a la temperatura que contiene las sustituciones P₃₃₆A y Y₃₃₈S.

40 Se transfirió pARM y pJH2 a RN4220 (15) por electroporación y posteriormente se procedió a la transducción usando el fago 85 (16) en *S. aureus* Newman (14) y LS-1 (11). En estas cepas se indujo a los plásmidos a insertarse en el cromosoma y después escindirse, para dejar mutaciones en el cromosoma de una proporción de transformantes, que generan Newman *clfAPYI*, Newman *clfAPYII*, LS-1 *clfAPYI* y LS-1 *clfAPYII*. Se cribaron los transformantes en relación con la pérdida del plásmido y una pérdida de actividad de unión a fibrinógeno. La integridad del gen *ClfA* se verificó por inmunotransferencia Southern usando una sonda de *clfA* (datos no mostrados). La expresión de una proteína inmunorreactiva (*ClfAPY*) se verificó por Western blotting usando 45 antisuero de conejos policlonal de la región A anti-*ClfA* (datos no mostrados). Las mutaciones se verificaron por PCR en los fragmentos de *KpnI-BamHI* de ADN genómico y la secuenciación comercial de los productos. Las 700 bases aproximadamente del gen *ClfA* de la cepa LS-1 que se secuenciaron eran idénticas a las bases correspondientes en el gen *clfA* Newman de la cepa Newman.

Producción de ClfA recombinante y ClfAPY

50 Se produjo una región A de ClfA recombinante marcada con His, dominios N123 (aminoácidos 40-559), a partir de pCF40 tal como se describe anteriormente (17), con una etapa de pulido adicional a través de una columna de intercambio iónico. Se usó el plásmido pCF77 PY (6) como plantilla para clonar los dominios N123 de *clfAPYI* en pQE30 para generar pCF40PY. Usando este plásmido, se produjo también *ClfAPY* por cromatografía de afinidad por níquel y cromatografía de intercambio aniónico, tal como se describió para rClfA. Se dializaron los eluatos frente a dos cambios de PBS antes de la concentración y la liofilización.

Experimentos de artritis séptica y sepsis

En los experimentos 1-3 se infectó a todos los ratones (n = 10 por grupo) con cepa Newman para provocar artritis. En los experimentos 4 y 5, se infectó a los ratones con cepa Newman y LS-1, respectivamente, para inducir sepsis (n = 10 por grupo).

5 Experimento 1 Se infectó a los ratones con inyección intravenosa con $3,5 \times 10^6$ UFC/ratón de cepa Newman de *S. aureus* o con $4,3 \times 10^6$ UFC/ratón de Newman *clfAPYI* mutante, ambas en 200 μ l de PBS. Se realizó un seguimiento clínico de artritis y de cambio de peso hasta el día 7. Se sacrificó a los ratones en el día 8, se evaluó el crecimiento renal de bacterias y se midieron las concentraciones de IL-6 sérico e IgG total. Se estudió histológicamente la sinovitis y la destrucción ósea en las articulaciones de las patas delanteras y traseras.

10 Experimento 2 Se infectó a los ratones con $5,0 \times 10^6$ UFC, $6,0 \times 10^6$ UFC o $4,3 \times 10^6$ UFC de cepa Newman de *S. aureus*, *clfAPYI* mutante o Newman *clfA::Erm^R* (*clfA* nula mutante), respectivamente. Se llevó un seguimiento de la artritis clínica y del cambio de peso hasta el día 7. Se sacrificó a los ratones en el día 7, se evaluó el crecimiento renal de bacterias y se midieron las concentraciones de IL-6 sérico e IgG total. Se estudió histológicamente la sinovitis y la destrucción ósea en las articulaciones de las patas delanteras y traseras.

15 Experimento 3 Se infectó a los ratones con $4,7 \times 10^6$ UFC, $3,2 \times 10^6$ UFC, $3,9 \times 10^6$ UFC o $4,8 \times 10^6$ UFC de cepa Newman de *S. aureus*, *clfAPYI* mutante, Newman *clfAPYII* mutante o Newman *clfA* nula mutante, respectivamente. Se llevó un seguimiento de la artritis clínica y del cambio de peso hasta el día 7. Se sacrificó a los ratones en el día 8 y se evaluó el crecimiento renal de bacterias.

Los resultados de los experimentos 1-3 fueron muy similares, con lo que se agruparon los datos y se presentaron en conjunto.

25 En el Experimento 4 se inyectó a los ratones por vía intravenosa $5,2 \times 10^7$ UFC, $5,1 \times 10^7$ UFC o $3,3 \times 10^7$ UFC de cepa Newman de *S. aureus*, *clfAPYI* mutante o *clfA* nula mutante, respectivamente. Se llevó un seguimiento de la mortalidad, el cambio de peso y la artritis clínica hasta el día 10.

En el Experimento 5 se infectó a los ratones con $9,4 \times 10^6$ UFC, $7,9 \times 10^6$ UFC, $10,7 \times 10^6$ UFC o $9,8 \times 10^6$ UFC de *S. aureus* cepa LS-1, LS-1 *clfAPYI* mutante, LS-1 *clfAPYII* mutante o LS-1 *clfA* nula mutante, respectivamente. Mortalidad, se llevó un seguimiento de la artritis clínica y del cambio de peso hasta el día 16.

Inyección intraauricular de bacterias

35 Se inyectó en una articulación rotuliana por ratón $2,4 \times 10^4$ UFC, $2,4 \times 10^4$ UFC, o $3,4 \times 10^4$ UFC de cepa Newman natural, *clfAPYI* mutante o *clfA* manipulada genéticamente mutante, respectivamente, en 20 μ l de PBS. N = 10 por grupo. Se sacrificó a los ratones 3 días más tarde, y se recogieron las articulaciones rotulianas para estudio histopatológico.

40 Vacunación con ClfA recombinante natural y mutante

Se disolvió rClfA40-559 purificada, rClfAPY 40-559 (es decir, rClfAPYI) o BSA en suero fisiológico salino y se emulsionó a 1:1 en adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories). Se inyectaron 200 μ l de la emulsión que contenían 30 μ g (= 0,53 nmol) de proteína por vía subcutánea (s.c.) en el día 0. Se realizó una primera inmunización de refuerzo con 30 μ g de proteína en suero fisiológico salino en adyuvante de Freund incompleto en el día 11. Se llevó a cabo una segunda inmunización de refuerzo en el día 21. En el día 30 se sangró a los ratones y se congeló el suero para un análisis posterior de las respuestas de anticuerpos.

En el día 31, se infectó a 14-15 ratones por grupo por inyección i.v. de $4,0 \times 10^6$ UFC/ratón para inducción de artritis séptica, o por $2,3 \times 10^7$ UFC/ratón para inducción de sepsis. Se llevó un seguimiento de artritis clínica, cambio de peso y mortalidad durante 11 y 15 días, respectivamente. Se evaluó el crecimiento bacteriano en los riñones en el experimento de artritis séptica.

Evaluación clínica de ratones infectados

55 La evaluación clínica se realizó en modo ciego. Se inspeccionó visualmente cada extremidad. La inspección produjo una puntuación de 0 a 3 (0, sin tumefacción ni eritema; 1, tumefacción y/o eritema leve; 2, tumefacción y/o eritema moderado; 3 tumefacción y/o eritema intenso). El índice artrítico se elaboró sumando las puntuaciones de las cuatro extremidades de un animal. También se examinó el estado global de cada ratón evaluando los signos de inflamación

sistémica, es decir, disminución de peso, reducción de la alerta y pelaje deslucido. En casos de infección sistémica grave, cuando se consideró que un ratón estaba demasiado enfermo para sobrevivir otras 24 h, se le sacrificó por dislocación cervical y se le consideró muerto a causa de sepsis.

5 Estudio histológico

El estudio histológico de las articulaciones se realizó usando una modificación (8) de un procedimiento descrito anteriormente (18).

10 Estudio bacteriológico de riñones infectados

Se diseccionaron asépticamente los riñones, se mantuvieron en hielo, se homogeneizaron, se diluyeron en serie en PBS y se extendieron en placas de agar en sangre. Después de 24 h de incubación a 37°C se determinó el número de UFC por par de riñones.

15

Medida de IgG en suero

Se midieron las concentraciones en suero de IgG total mediante la técnica de inmunodifusión radial (19). Se adquirió un patrón de IgG de cabra antirratón e IgG de ratón en Southern Biotech, Birmingham, AL.

20

Anticuerpos específicos - ELISA

Se obtuvieron muestras séricas de ratones inmunizados 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo. Se midió la respuesta sérica de anticuerpos específica contra rClfA y rClfAPY mediante ELISA. Se cubrieron microplacas (96 pocillos; Nunc) con 5 µg/ml de proteína recombinante en PBS. Se diluyó agente de bloqueo, muestras séricas, anticuerpos biotinilados y ExtrAvidinproxidasa en PBS. El ensayo se realizó de acuerdo con una descripción anterior (8). Se diluyeron todas las muestras séricas a 1:20.000, y se monitorizó la respuesta de anticuerpos en forma de absorbancia a 405 nm.

25

30 En una segunda ejecución, para obtener una medida más precisa de las respuestas de anticuerpos específicos en los diferentes grupos de inmunización, se determinaron las respuestas para varias diluciones en suero. Así, se diluyeron todas las muestras séricas a 1:5.000, 1:20.000, 1:80.000 y 1:320.000, y se monitorizó la respuesta de anticuerpos en forma de absorbancia a 405 nm.

35 Análisis de IL-6

El valor sérico de IL-6 se detectó por un procedimiento descrito anteriormente (20).

Análisis estadístico

40

La evaluación estadística se realizó usando la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró el valor $P < 0,05$ como significativo. Los datos se refieren en forma de medianas, intervalos intercuartílicos e intervalos centrales del 80%, salvo que se mencione lo contrario.

45 RESULTADOS

El intercambio de dos aminoácidos necesarios para unión de ClfA a fibrinógeno obstaculiza el desarrollo de artritis séptica y sepsis

50 Se modificaron dos aminoácidos (P336 y Y338) de los que se sabe que son necesarios para la unión a fibrinógeno por ClfA mediante intercambio alélico para crear mutantes de cepas Newman y LS1 que expresaban una proteína ClfA de no unión a fibrinógeno en la superficie celular. Se midió el nivel de expresión y la integridad de la proteína por Western blotting que estableció que existía una buena expresión de las proteínas mutantes en la superficie bacteriana y que la proteína expresada tenía el tamaño correcto.

55

Se investigó la capacidad de Newman natural y Newman *clfA* P₃₃₆S Y₃₃₈A (*clfAPYI*) para provocar artritis séptica. La artritis séptica se indujo mediante inoculación intravenosa de $3,5 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ unidades de formación de colonias (UFC) y $3,2 \times 10^6$ a $6,0 \times 10^8$ UFC de Newman natural y *clfAPYI* mutante, respectivamente. Se estudió el desarrollo de artritis clínicamente durante 7 días. La *clfAPYI* mutante provocó una artritis significativamente menos grave que la

cepa natural en todo el periodo del experimento ($P > 0,001$, Fig. 1 A). La frecuencia de artritis era inferior para *clfAPYI* Newman en la mayor parte de los puntos de tiempo (Fig. 6).

Inesperadamente, parece que la nueva composición de aminoácidos en la molécula ClfAPYI se ajusta a la interacción con la defensa antibacteriana del hospedador. Para verificar esta posibilidad, se preparó una nueva construcción donde diferentes aminoácidos se sustituyeron por P336 y Y338 (*clfA* P₃₃₆A Y₃₃₈S: *clfAPYII*). Los ratones a los que se inocularon $3,9 \times 10^6$ UFC de *clfAPYII* Newman desarrollaron artritis en la misma medida que la *clfAPYI* mutante (Fig. 1A), y con una frecuencia similar (Fig. 6). Este resultado sugiere intensamente que la pérdida de unión a fibrinógeno es responsable del nivel reducido de artritis.

Es posible que la ClfA intervenga en el desarrollo de artritis por mecanismos que no implican unión a fibrinógeno. Para comprobarlo se comparó un mutante de delección de *ClfA* que carece de proteína ClfA con mutantes que expresan la proteína modificada de ClfA de no unión a fibrinógeno. Sin embargo, los ratones que fueron infectados con de $4,3 \times 10^6$ a $4,8 \times 10^6$ UFC de *clfA* nula mutante desarrollaron artritis de una forma no diferente a los ratones infectados con *clfAPYI* y *clfAPYII* mutante (Fig. 1A). La frecuencia de artritis fue asimismo indistinguible (Fig. 6).

Se investigaron también histológicamente las articulaciones infectadas. La sinovitis en ratones de *clfAPYI* Newman infectados fue significativamente más leve que en ratones no manipulados genéticamente infectados en los experimentos 1 y 2 ($P = 0,02$ y $0,001$, respectivamente). La destrucción ósea, una causa principal de secuelas en la artritis séptica humana, estuvo casi ausente en las muestras infectadas con *clfAPYI* Newman (Experimento 2, $P = 0,001$). La sinovitis y la destrucción ósea inducidas por la *clfA* nula mutante Newman fueron también menos pronunciadas que en ratones no manipulados genéticamente infectados con cepa Newman ($P = 0,003$ y $0,006$, respectivamente), si bien algo más grave que en el grupo *clfAPYI* Newman, aunque no demasiado.

A continuación se analizaron las consecuencias metabólicas de las mutaciones de ClfA para el proceso infeccioso. Los ratones infectados con la cepa Newman natural perdieron aproximadamente el 30% de su peso corporal durante el periodo del experimento. Los ratones que fueron infectados con los mutantes deficientes en unión a fibrinógeno *clfAPYI* Newman y *clfAPYII* Newman apenas perdieron peso ($P > 0,0001$ frente al tipo natural). En cambio, la *clfA* nula mutante Newman tuvo un efecto intermedio en la pérdida de peso, provocando un valor significativamente menor que la cepa natural, pero significativamente mayor que las cepas mutantes de *clfAPYI* y *clfAPYII* ($P \leq 0,02$ en la mayoría de los casos, Fig. 1B).

Las concentraciones séricas de IL-6, una medida de la respuesta inflamatoria sistémica, fueron analizadas en el día 7-8 de infección. El patrón de expresión de IL-6 fue similar a los cambios de peso. La cepa Newman natural evocó altas concentraciones séricas de IL-6 ($4,8$ ($2,8, 5,7$) ng/ml), *clfAPYI* mutante Newman evocó valores de IL-6 considerablemente menores ($0,2$ ($0,07, 2,4$) ng/ml, $P < 0,0001$) mientras que la *clfA* nula mutante Newman produjo una respuesta intermedia ($2,5$ ($1,3, 3,2$) ng/ml) con diferencias significativas para el grupo natural y *clfAPYI* ($P = 0,009$ y $P = 0,008$, respectivamente) (mediana, intervalo intercuartílico).

El crecimiento de bacterias en los riñones fue significativamente mayor en ratones infectados con cepa Newman natural, en comparación con *clfAPYI* mutantes Newman y *clfA* nula mutante Newman ($P < 0,0001$, $P = 0,011$, y $P = 0,005$, respectivamente; Figura 2). Los ratones infectados con *clfA* nula mutante Newman tuvieron significativamente más crecimiento bacteriano en los riñones que los ratones infectados con *clfAPYI* Newman ($P = 0,0005$, Fig. 2).

El valor total en suero de IgG en ratones se midió en el día 7-8 de infección. Se observó un aumento significativamente menor de las concentraciones de IgG en los grupos infectados con *clfAPYI* Newman y *clfA* nula mutante Newman en comparación con ratones infectados con la cepa natural ($3,1$ ($1,2, 4,9$); $2,3$ ($1,0, 2,6$); y $6,4$ ($5,0, 11,0$), respectivamente (mediana, intervalo intercuartílico); $P \leq 0,0003$). No se apreciaron diferencias significativas entre los dos grupos mutantes.

La mortalidad fue del 17% en los ratones infectados con cepa Newman natural, del 0% en los grupos *clfAPYI* Newman y *clfAPYII* mutante y del 30% en el grupo de *clfA* nula mutante Newman. Se produjeron diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad entre los grupos natural y *clfAPYI*, y entre los grupos *clfAPYI* y *clfA* nula mutante ($P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente).

Parece que los signos directos e indirectos de inflamación sistémica son menores en ratones infectados con *S. aureus* que expresa ClfA que es deficiente en unión a fibrinógeno. Inesperadamente, la cepa que carecía de expresión de ClfA indujo en total más inflamación sistémica que una cepa que expresa ClfAPY mutante.

La sepsis se indujo en ratones aumentando la dosis de inoculación de *S. aureus*. Se infectó a los ratones con $5,2 \times 10^7$ UFC de Newman natural, $5,1 \times 10^7$ UFC de *clfAPYI* mutante Newman y $3,3 \times 10^7$ UFC de *clfA* nula mutante Newman. En un plazo de 5 días se sacrificó a todos los ratones no manipulados genéticamente infectados, pero sólo un ratón *clfAPYI* mutante de diez había muerto después de 10 días de infección ($P < 0,0001$, Fig. 3). Los ratones infectados con *clfA* nula mutante también sobrevivieron un tiempo significativamente más breve que los ratones infectados con *clfAPYI* mutante ($P < 0,0001$, Fig. 3). En este experimento los ratones sometidos a prueba de provocación con *ClfA* nula mutante desarrollaron significativamente más artritis que los grupos de *clfAPYI* mutante, mientras que al mismo tiempo perdieron significativamente más peso (Fig. 7 y 8). Así, por analogía con las medidas de inflamación sistémica en el experimento de artritis sépticas, la supervivencia de los ratones se prolonga si se expresa la molécula de *ClfA*, siempre que carezca de las propiedades de unión a fibrinógeno.

Inyección de bacterias en articulaciones

Para probar si la reacción inflamatoria en la articulación depende de la unión a fibrinógeno, se inyectó cepa Newman natural, Newman *clfAPYI* o Newman *clfA* nula directamente en una articulación rotuliana de los ratones, sorteando así el compartimento sistémico. La sinovitis, incluida la infiltración polimorfonuclear de la cavidad articular, y la destrucción ósea se estudiaron mediante histología 3 días más tarde. Los ratones recibieron $2,4 \times 10^4$ UFC de cepa natural, $2,4 \times 10^4$ UFC de *ClfA* nulo mutante, o $3,4 \times 10^4$ UFC de *clfAPYI* mutante en una rodilla. El índice histológico de sinovitis e infiltración polimorfonuclear en la cavidad articular fue de 0,25 (0, 3,0) para rodillas infectadas con cepa natural, 2,38 (0,25, 3,0) para *ClfA* nula mutante y 0,25 (0, 0,25) para *clfAPYI* mutante (mediana, intervalo intercuartílico). El índice histológico para destrucción de hueso fue de 0 (0, 1,0) para cepa natural, 1,0 (0, 1,0) para *ClfA* nula mutante y 0 (0, 0) para *clfAPYI* mutante (mediana, intervalo intercuartílico; $P = 0,01$ entre *clfAPYI* mutante y *ClfA* nula mutante). Dado que la *clfAPYI* mutante evocó muy poca sinovitis y destrucción, pese al hecho de que se suministró un 42% más de esa cepa a ratones que las otras cepas, se concluye que la unión a fibrinógeno promovida por *ClfA* es necesaria para una respuesta inflamatoria máxima dentro de la articulación. De nuevo, la ausencia de expresión de *ClfA* promovió la inflamación en comparación con *ClfA* mutante deficiente en unión a fibrinógeno.

Mutación PY en cepa LS-1

Para determinar si la capacidad de *ClfA* de unión a fibrinógeno influye en la virulencia de otras cepas de *S. aureus*, se procedió a transducción de mutaciones de *clfAPYI*, *clfAPYII* y *clfA* nulas en TSST-1 que expresa la cepa de *S. aureus* LS-1. Se sometió a los ratones a prueba de provocación con $9,4 \times 10^6$ UFC de LS-1 natural, $7,9 \times 10^6$ UFC de LS-1 *clfAPYI*, $10,7 \times 10^6$ UFC de LS-1 *clfAPYII* o $9,4 \times 10^6$ UFC de la cepa LS-1 de *clfA* nula mutante. Se estudió la sepsis con un seguimiento de la tasa de supervivencia. Después de 16 días sólo el 40% de ratones sometidos a prueba de provocación con la cepa natural estaban vivos mientras que el 90% de los ratones con prueba de provocación con los grupos de *clfAPYI* mutante y *clfA* nula mutante y el 80% de los ratones infectados con *clfAPYII* mutante estaban vivos (Fig. 4). *clfAPYI* mutante y *ClfA* nulo mutante de LS-1 fueron significativamente menos virulentos ($P = 0,014$, $P = 0,05$ y $P = 0,03$, respectivamente).

Inmunización con proteínas *ClfA* recombinantes

El efecto de la vacunación con proteína recombinante de dominio A de *ClfA* natural (r*ClfA*) y proteína *ClfAPYI* mutante (r*ClfAPY*) se estudió en el modelo de artritis séptica y en el modelo de sepsis. Los ratones fueron sensibilizados y después se les reforzó dos veces con BSA de proteína de control, r*ClfA* o r*ClfAPY*, y posteriormente fueron infectados con $4,0 \times 10^6$ UFC de cepa Newman de *S. aureus* para inducir artritis séptica, o con $2,3 \times 10^7$ UFC de cepa Newman para inducir sepsis. La inmunización con r*ClfAPY* (es decir, dominio A de proteína recombinante *ClfAPYI*) protegió significativamente contra la muerte por sepsis en comparación con los ratones de control ($P = 0,01$, Fig. 5) mientras que la inmunización con r*ClfA* no obtuvo una protección significativa. Un día antes de la infección bacteriana se produjo una respuesta de anticuerpos en suero específica muy superior para r*ClfAPY* y r*ClfA* en ratones inmunizados con r*ClfAPY* ($A_{405} = 0,39$ (0,33, 0,56) y 0,71 (0,52, 0,81)) en comparación con ratones inmunizados con r*ClfA* ($A_{405} = 0,13$ (0,07, 0,17) y 0,15 (0,10, 0,24), $P < 0,0001$ en las dos comparaciones (mediana, intervalo intercuartílico)). Los animales inmunizados de control tenían sólo niveles basales ($A_{405} \text{ nm} = 0$ y 0,01 (0, 0,01) (mediana, intervalo intercuartílico)). Los ratones inmunizados destinados a ser infectados con la dosis bacteriana artrítica inferior mostraron respuestas a anticuerpos similares para r*ClfA* y r*ClfAPY* que los ratones en los que se indujo la sepsis (datos no mostrados). La inmunización con r*ClfA* y con r*ClfAPY* protegió contra el desarrollo de artritis, aunque la protección no era significativa (Fig. 9).

Durante el día 5 a 9 después de infección la pérdida de peso se redujo significativamente en los ratones

inmunizados con rClfAPY y rClfA, en comparación con los ratones de control (datos no mostrados).

Se observó una tendencia a reducción del crecimiento bacteriano en los riñones de los ratones inmunizados con rClfAPY o rClfA en el día 11 después de la infección (BSA: 38 (3, 436); rClfAPY: 7 (2, 17); rClfA: 10 (7, 54) x 10⁷ UFC/par de riñones).

Para obtener una medida más precisa de las respuestas de anticuerpos específicos en los diferentes grupos de inmunización, las respuestas se determinaron para varias diluciones séricas (la segunda pasada). Los datos muestran que se produjeron valoraciones muy probablemente superiores de anticuerpos específicos en sueros de ratones inmunizados con rClfAPY en antígenos rClfAPY y rClfA naturales, tanto en los ratones que no serían infectados con la dosis bacteriana para sepsis y artritis, respectivamente, como en el suero de ratones inmunizados con rClfA natural, dado que se produjeron respuestas a anticuerpos significativamente superiores medidas en forma de absorbancia en ratones inmunizados con rClfAPY para cada dilución sérica en todas las comparaciones (P < 0,0001 a P = 0,008, Figura 12-15). La inmunización con BSA evocó sólo una respuesta de anticuerpos basal.

CONCLUSIÓN

Los resultados sugieren intensamente que la interacción ClfA-fibrinógeno es crucial para la virulencia bacteriana y el resultado patológico. La capacidad de ClfA para unirse a fibrinógeno se asoció con una mayor virulencia en términos de capacidad de causar muerte por sepsis. En las dos cepas estafilocócicas sometidas a ensayo, una *clfAPY* mutante indujo menos muerte por sepsis que la cepa natural. Además, la gravedad de la artritis se redujo de modo acusado en ratones infectados con la *clfAPY* mutante de no unión a fibrinógeno.

Un mecanismo probable para la promoción de virulencia por la interacción de superficie celular fibrinógeno-bacteriana es la inhibición de la fagocitosis de neutrófilos (5). Los neutrófilos son cruciales para la defensa del hospedador en la primera fase de infección por *S. aureus* (13). Sin neutrófilos, el crecimiento bacteriano aumenta de modo acusado en la sangre y los riñones, y la frecuencia de artritis y de mortalidad aumenta. La inhibición mediada por fibrinógeno de la fagocitosis de neutrófilos por ClfA podría explicar al menos en parte la virulencia más pronunciada de natural *S. aureus* en comparación con *clfAPY* mutantes. La unión de fibrinógeno a ClfA podría reducir la opsonofagocitosis por neutrófilos al reducir el depósito de opsonina o el acceso a opsoninas por receptores de neutrófilos. Alternativamente, el fibrinógeno ligado podría bloquear la unión de un factor de hospedador protector desconocido a *S. aureus*. Otra opción es que la interacción fibrinógeno-ClfA promueve el paso bacteriano desde el vaso sanguíneo en el tejido o promueve la colonización en los tejidos.

Inesperadamente, los datos de los autores de la invención muestran también que la ClfA nula mutante era más virulenta que las cepas de *clfAPY* mutante. Posiblemente la proteína ClfA tiene funciones *in vivo* distintas que la interacción con fibrinógeno. Esta interacción es claramente desventajosa para el hospedador tal como se muestra en este estudio. En la actualidad no se han establecido correspondencias adecuadas con otras funciones de ClfA pero la agregación de plaquetas no dependiente del fibrinógeno ejercida por ClfA podría producir el atrapamiento de grandes cantidades de *S. aureus* en circulación con la ulterior eliminación de los complejos de bacterias-plaquetas a través del sistema reticuloendotelial. Dicha eliminación de estafilococos mediada por agregación de plaquetas tendría lugar fácilmente en las cepas naturales y *clfAPY* mutadas pero no en ClfA manipulada genéticamente. Mientras en la cepa natural la interacción con fibrinógeno podría oscurecer los otros acontecimientos, en las *clfAPY* mutantes dicha eliminación bacteriana podría ser altamente beneficiosa para el hospedador.

El ClfA mutante manipulado genéticamente protegía contra la muerte por sepsis en el mismo grado que la mutación de *clfAPY* en la cepa LS-1 de *S. aureus*, pero protegía menos, o nada, en la cepa Newman. El impacto global de expresión de ClfA en la virulencia bacteriana podría diferir entre distintas cepas de *S. aureus* dependiendo del nivel de expresión y de la presencia de otros factores de virulencia.

La cuestión sobre si la *clfAPY* mutante muestra una virulencia igual o inferior una vez que está en la cavidad articular adquiere cierta importancia teniendo presente que en el líquido sinovial inflamado el fibrinógeno y la fibrina son abundantes. Los datos de los autores de la invención sugieren que la *clfAPY* mutante es menos destructiva para el cartílago y el hueso.

El efecto protector del mutante P₃₃₈Y₃₃₈ de no unión a fibrinógeno del dominio A de ClfA recombinante fue mayor que para la rClfA natural. La inmunización con ClfAPY indujo muy probablemente una mejor respuesta inmunitaria dado que se evocaron mayores respuestas de anticuerpos específicos contra la proteína ClfA inmunógena y natural. De forma más importante, indujo una respuesta inmunitaria protectora superior contra la muerte por sepsis que la ClfA

natural.

En conclusión, los resultados de los autores de la invención muestran que rClfAPY es un mejor candidato de vacuna que la ClfA recombinante natural. Los autores de la invención conjeturan que la unión de fibrinógeno por proteína ClfA natural durante la fase de inmunización disminuye la presentación de antígenos debido a la ocultación de epítopos importantes en la molécula de ClfA y con ello degrada la producción de anticuerpos específicos.

Ejemplo 2

10 Truncamiento de región A de rClfA que comprende N2 y N3 (rClfA 221-559)

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS:

En este ejemplo se siguieron los protocolos indicados en el Ejemplo 1 y se usó:

15

- rClfA 221-559 (es decir, truncamiento de región A de ClfA que comprende N2 y N3 correspondiente a aminoácidos 220-559)

- rClfAPY221-559; y

- BSA.

20

Había también 15 ratones NMRI hembra por grupo que tenían 8 semanas de vida al inicio de los experimentos. En este Ejemplo, las construcciones usadas para inmunización fueron truncamiento N2N3 natural/salvaje de ClfA, truncamiento N2N3 de ClfA con mutación PY tal como se define en el Ejemplo 1. Se usó BSA como control.

25 Vacunación con ClfA recombinante natural y mutante

Los ratones fueron inmunizados con rClfA 221-559, rClfAPY 221-559 o BSA de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 1.

30 Se disolvió rClfA221-559, rClfAPY221-559 (es decir, subdominios N2 y N3 de proteína recombinante A de ClfAPYI) o BSA purificados en PBS y se emulsionó 1:1 en adyuvante completo de Freund. Se inyectaron 200 μ l de la emulsión que contenían 30 μ g (= 0,79 nmol) de proteína s.c. en el día 0. La primera inmunización de refuerzo con 30 μ g de proteína en suero fisiológico salino en adyuvante de Freund incompleto se realizó en el día 12. La segunda inmunización de refuerzo se realizó en el día 22. En el día 31 se sangró a los ratones y se congeló el suero para
35 análisis posterior de respuestas de anticuerpo.

Anticuerpos específicos - ELISA

Las muestras séricas de ratones inmunizados se obtuvieron 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo.

40 La respuesta sérica de anticuerpos específicos contra rClfA221-559 y rClfAPY221-559 se midió mediante ELISA. Se cubrieron las microplacas (96 pocillos; Nunc) con 5 μ g/ml de proteína recombinante en PBS. Se diluyó el agente de bloqueo, las muestras séricas, los anticuerpos biotinilados y la ExtrAvidina-proxidasa en PBS. El ensayo se realizó de acuerdo con una descripción anterior (8). Todas las muestras séricas se diluyeron 1:5.000, 1:20.000, 1:80.000 y 1:320.000, y la respuesta a anticuerpos se monitorizó en forma de absorbancia a 405 nm.

45

RESULTADOS:

RESPUESTA DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS:

50 La respuesta de anticuerpos se midió por absorbancia en un ensayo ELISA, como en el Ejemplo 1, con cuatro diluciones séricas diferentes. Los datos obtenidos fueron muy similares a los datos del Ejemplo 1.

Se encontró que la inmunización con rClfAPY221-559 produjo muy probablemente valoraciones superiores de anticuerpos específicos en rClfA221-559 natural y rClfAPY221-559, que la inmunización con rClfA221-599 natural, dado que existían respuestas a anticuerpos significativamente más elevadas medidas en forma de absorbancia en ratones inmunizados con rClfAPY221-559 en cada dilución sérica para todas las comparaciones salvo una (P = 0,001 a 0,025, véanse Figuras 16 y 17). La inmunización con BSA evocó sólo niveles basales de respuesta de anticuerpos.

CONCLUSIÓN

Los autores de la invención encontraron que la inmunización con una proteína rClfAPY221-559 produjo respuestas a anticuerpos significativamente superiores al inmunógeno y a la proteína ClfA natural que la inmunización con la proteína natural.

Basándose en estos hallazgos, los autores de la invención concluyen que la inmunización PY, con independencia de si la proteína PY comprende los aminoácidos 40 a 550 como en el Ejemplo 1 o los aminoácidos 221 a 559 como en el Ejemplo 2, induce una mejor respuesta inmunitaria que la inmunización con ClfA natural del tamaño correspondiente.

Ejemplo 3**Truncamiento de región A de ClfA A (truncamiento cerradura δ/δ)**

15

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS:

En este ejemplo se usaron los protocolos indicados en el Ejemplo 1 y se usó la siguiente construcción:

20 - rClfA 221-531 (es decir, truncamiento de la región A de rClfA que comprende N2 y N3 de los aminoácidos 220-559 pero sin el péptido de cerradura de aminoácidos 532-538 y los posteriores residuos ricos en prolina.

En el grupo había 15 ratones NMRI hembra que tenían 8 semanas de vida al inicio del experimento. En este Ejemplo, se usó la construcción anterior para inmunización. Los ratones fueron inmunizados con el truncamiento anterior de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 1.

25

Vacunación con ClfA recombinante natural y mutante

Se disolvió rClfA221-531 purificada en PBS y se emulsionó 1:1 en adyuvante completo de Freund. Se inyectaron 200 μ l de la emulsión que contenían 0,79 nmol de proteína s.c. en el día 0. La primera inmunización de refuerzo con 0,79 nmol de proteína en suero fisiológico salino en adyuvante de Freund incompleto se realizó en el día 12. La segunda inmunización de refuerzo se realizó día 22. En el día 31 se sangró a los ratones y se congeló el suero para análisis posterior de respuestas a anticuerpos.

30

35 Anticuerpos específicos - ELISA

Las muestras séricas de ratones inmunizados se obtuvieron 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo. Las concentraciones séricas de anticuerpos específicos se midió por ELISA. Se cubrieron las microplacas (96 pocillos; Nunc) con 4,6 μ g/ml de proteína rClfA221-531 que es equimolar a 5 μ g/ml de rClfA221-559 y rClfAPY221-559 de los Ejemplos 1 y 2. Se diluyó el agente de bloqueo, las muestras séricas, los anticuerpos biotinilados y la ExtrAvidina-proxidasa en PBS. El ensayo se realizó de acuerdo con una descripción anterior (8). Todas las muestras séricas se diluyeron 1:5.000, 1:20.000, 1:80.000 y 1:320.000, y la respuesta a anticuerpos se monitorizó en forma de absorbancia a 405 nm.

40

45 RESULTADOS:

La respuesta de anticuerpos se midió por absorbancia en un ensayo ELISA, como en el Ejemplo 1. Se encontró que la inmunización con rClfA221-531 produjo una respuesta inmunitaria, medida como una respuesta de anticuerpos específicos (Figura 18).

50

CONCLUSIÓN:

Los autores encuentran que rClfA221-531 actúa como un inmunógeno, dado que el antígeno evoca una respuesta de anticuerpos específicos.

55

REFERENCIAS

1. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O'Neill G, Day NPJ (2002) Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 70:4987-

- 4996.
2. McDevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, Bell E, Turner N, McEntire L, Foster T, Höök M (1997) Characterization of the interaction between the Staphylococcus aureus clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *Eur J Biochem* 247:416-424.
 - 5 3. McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ (1994) Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol* 11:237-248.
 4. Palmqvist N, Patti JM, Tarkowski A, Josefsson E (2004) Expression of staphylococcal clumping factor A impedes macrophage phagocytosis. *Microb Infect* 6:188-195.
 5. Higgins J, Loughman A, van Kessel KPM, van Strijp JAG, Foster TJ (2006) Clumping factor A of Staphylococcus aureus inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *FEMS Microbiol Lett* 258:290-296.
 - 10 6. Loughman A, Fitzgerald JR, Brennan MP, Higgins J, Downer R, Cox D, Foster TJ (2005) Roles of fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by Staphylococcus aureus clumping factor A. *Mol Microbiol* 57:804-818.
 7. O'Brien L, Kerrigan SW, Kaw G., Hogan M., Penadés J., Litt D., Fitzgerald D.J., Foster T.J. & Cox D. (2002) Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by Staphylococcus aureus: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Mol Microbiol* 44, 1033-1044.
 - 15 8. Josefsson E., Hartford O., O'Brien L, Patti JM, Foster T (2001) Protection against experimental Staphylococcus aureus arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. *J Infect Dis* 184:1572-1580.
 9. Palmqvist N, Foster T, Fitzgerald R, Josefsson E, Tarkowski A (2005) Fibronectin-binding proteins and fibrinogen-binding clumping factors play distinct roles in staphylococcal arthritis and systemic inflammation. *J Inf Dis* 191:791-798.
 10. Deivanayagam CCS, Wann ER, Chen W, Carson M, Rajashankar KR, Höök M, Narayana SVL (2002) A novel variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of Staphylococcus aureus: crystal structure of the fibrinogenbinding MSCRAMM, clumping factor A. *The EMBO Journal* 21:6660-6672.
 - 25 11. Bremell T, Lange S, Yacoub A, Ryden C, Tarkowski A (1991) Experimental Staphylococcus aureus arthritis in mice. *Infect Immun* 59:2615-2623.
 12. Sakiniene E, Bremell T, Tarkowski A (1996) Addition of corticosteroids to antibiotic treatment ameliorates the course of experimental Staphylococcus aureus arthritis. *Arthritis Rheumatism* 39:1596-1605.
 13. Verdrengh M, Tarkowski A (1997) Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by Staphylococcus aureus. *Infect Immun* 65:2517-2521.
 - 30 14. Duthie ES, Lorenz LL (1952) Staphylococcal coagulase: mode of action and antigenicity. *J Gen Microbiol* 6:95-107.
 15. Kreiswirth BN, Löfdahl S, Betley MJ, O'Reilly M, Schlievert PM, Bergdoll MS, Novick RP (1983) The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* 305:709-712.
 - 35 16. Foster TJ (1998) in *Methods in Microbiology* Vol. 27: Bacterial Pathogenesis, eds Williams P, Ketley J, Salmond G (Academic Press, London), pp 433-454.
 17. O'Connell DP, Nanavaty T, McDevitt D, Gurusiddappa S, Höök M, Foster TJ (1998) The fibrinogen-binding MSCRAMM (clumping factor) of Staphylococcus aureus has a Ca²⁺-dependent inhibitory site. *J Biol Chem* 273:6821-6829.
 - 40 18. Sakiniene E, Bremell T, Tarkowski A (1999) Complement depletion aggravates Staphylococcus aureus septicaemia and septic arthritis. *Clin Exp Immunol* 115:95-102.
 19. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2:235-254.
 20. Bremell T, Abdelnour A, Tarkowski A (1992) Histopathological and serological progression of experimental Staphylococcus aureus arthritis. *Infect Immun* 60:2976-2985.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Provost Fellows and Scholars of the College of the Holy and Undivided Trinity of Queen Elizabeth Near
50 Dublin

<120> Tratamiento de infecciones microbianas

<130> 31546WO

55

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.3

ES 2 599 953 T3

<210> 1
 <211> 933
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de proteínas de longitud completa (naturales) ClfA recombinantes

<400> 1

10

```

Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
 1          5          10          15

Gly Val Ala Ser Val Leu Val Gly Thr Leu Ile Gly Phe Gly Leu Leu
          20          25          30

Ser Ser Lys Glu Ala Asp Ala Ser Glu Asn Ser Val Thr Gln Ser Asp
          35          40          45

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
 50          55          60

Ala Pro Lys Thr Asp Asp Thr Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Ser Ser
65          70          75          80

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
          85          90          95

Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
100          105          110

Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr Thr Thr Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro
115          120          125

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
130          135          140

Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
145          150          155          160
    
```

ES 2 599 953 T3

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
 165 170 175
 Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
 180 185 190
 Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
 195 200 205
 Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
 210 215 220
 Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
 225 230 235 240
 Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
 245 250 255
 Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
 260 265 270
 Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
 275 280 285
 Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
 290 295 300
 Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
 305 310 315 320
 Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
 325 330 335
 Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu
 340 345 350
 Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
 355 360 365
 Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
 370 375 380
 Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
 385 390 395 400

ES 2 599 953 T3

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu
 405 410 415

Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser
 420 425 430

Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
 435 440 445

Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile
 450 455 460

Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp
 465 470 475 480

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
 485 490 495

Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr
 500 505 510

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
 515 520 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
 530 535 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu Asp
 545 550 555 560

Ser Asp Ser Asp Pro Gly Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ser Asp
 565 570 575

Ser Gly Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Thr Ser Asp Ser Gly Ser Asp
 580 585 590

Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp
 595 600 605

Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Asp
 610 615 620

Asn Asp Ser Asp
 625 630 635 640

ES 2 599 953 T3

Ser Asp
645 650 655

Ser Asp
660 665 670

Ser Asp
675 680 685

Ser Asp
690 695 700

Ser Asp
705 710 715 720

Ser Asp
725 730 735

Ser Asp
740 745 750

Ser Asp Ser Ala
755 760 765

Ser Asp
770 775 780

Ser Asp
785 790 795 800

Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp
805 810 815

Ser Asp
820 825 830

Ser Asp Ser Asp Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Asp
835 840 845

Ser Ser Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asn Ser Asp Ser Glu
850 855 860

Ser Gly Ser Asn Asn Asn Val Val Pro Pro Asn Ser Pro Lys Asn Gly
865 870 875 880

Thr Asn Ala Ser Asn Lys Asn Glu Ala Lys Asp Ser Lys Glu Pro Leu

ES 2 599 953 T3

aat gcg gaa aat gtt tca aca acg caa gat act tca act gaa gca aca Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr 130 135 140	432
cct tca aac aat gaa tca gct cca cag agt aca gat gca agt aat aaa Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys 145 150 155 160	480
gat gta gtt aat caa gcg gtt aat aca agt gcg cct aga atg aga gca Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala 165 170 175	528
ttt agt tta gcg gca gta gct gca gat gca ccg gca gct ggc aca gat Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp 180 185 190	576
att acg aat cag ttg acg aat gtg aca gtt ggt att gac tct ggt acg Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr 195 200 205	624
act gtg tat ccg cac caa gca ggt tat gtc aaa ctg aat tat ggt ttt Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe 210 215 220	672
tca gtg cct aat tct gct gtt aaa ggt gac aca ttc aaa ata act gta Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val 225 230 235 240	720
cct aaa gaa tta aac tta aat ggt gta act tca act gct aaa gtg cca Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro 245 250 255	768
cca att atg gct gga gat caa gta ttg gca aat ggt gta atc gat agt Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser 260 265 270	816
gat ggt aat gtt att tat aca ttt aca gac tat gta aat act aaa gat Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp 275 280 285	864
gat gta aaa gca act ttg acc atg ccc gct tat att gac cct gaa aat Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn 290 295 300	912
ggt aaa aag aca ggt aat gtg aca ttg gct act ggc ata ggt agt aca Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr 305 310 315 320	960
aca gca aac aaa aca gta tta gta gat tat gaa aaa tat ggt aag ttt Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe 325 330 335	1008
tat aac tta tct att aaa ggt aca att gac caa atc gat aaa aca aat Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn 340 345 350	1056
aat acg tat cgt cag aca att tat gtc aat cca agt gga gat aac gtt Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val 355 360 365	1104
att gcg ccg gtt tta aca ggt aat tta aaa cca aat acg gat agt aat	1152

ES 2 599 953 T3

Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn
 370 375 380

gca tta ata gat cag caa aat aca agt att aaa gta tat aaa gta gat 1200
 Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp
 385 390 400

aat gca gct gat tta tct gaa agt tac ttt gtg aat cca gaa aac ttt 1248
 Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe
 405 410 415

gag gat gtc act aat agt gtg aat att aca ttc cca aat cca aat caa 1296
 Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln
 420 425 430

tat aaa gta gag ttt aat acg cct gat gat caa att aca aca ccg tat 1344
 Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr
 435 440 445

ata gta gtt gtt aat ggt cat att gat ccg aat agc aaa ggt gat tta 1392
 Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu
 450 455 460

gct tta cgt tca act tta tat ggg tat aac tcg aat ata att tgg cgc 1440
 Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg
 465 470 475 480

tct atg tca tgg gac aac gaa gta gca ttt aat aac gga tca ggt tct 1488
 Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser
 485 490 495

ggt gac ggt atc gat aaa cca gtt gtt cct gaa caa cct gat gag cct 1536
 Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro
 500 505 510

ggt gaa att gaa cca att cca gag 1560
 Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
 515 520

<210> 3

<211> 520

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 3

Ser Glu Asn Ser Val Thr Gln Ser Asp Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala Ala Pro Lys Thr Asp Asp Thr
 20 25 30

Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Ser Ser Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr
 35 40 45

ES 2 599 953 T3

Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser
50 55 60

Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr
65 70 75 80

Thr Thr Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe
100 105 110

Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr
115 120 125

Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr
130 135 140

Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys
145 150 155 160

Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala
165 170 175

Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp
180 185 190

Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr
195 200 205

Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe
210 215 220

Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val
225 230 235 240

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

Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser
260 265 270

Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp
275 280 285

ES 2 599 953 T3

Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn
 290 295 300
 Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr
 305 310 315 320
 Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe
 325 330 335
 Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn
 340 345 350
 Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val
 355 360 365
 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn
 370 375 380
 Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp
 385 390 395 400
 Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe
 405 410 415
 Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln
 420 425 430
 Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr
 435 440 445
 Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu
 450 455 460
 Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg
 465 470 475 480
 Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser
 485 490 495
 Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro
 500 505 510
 Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
 515 520

<210> 4
 <211> 520
 5 <212> PRT

ES 2 599 953 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Regiones de dominio A ClfA N1 N2 N3 con alteraciones (ClfA P336S Y338A)

5

<400> 4

Ser Glu Asn Ser Val Thr Gln Ser Asp Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala Ala Pro Lys Thr Asp Asp Thr
 20 25 30

Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Ser Ser Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr
 35 40 45

Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser
 50 55 60

Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr
 65 70 75 80

Thr Thr Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn
 85 90 95

Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe
 100 105 110

Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr
 115 120 125

Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr
 130 135 140

Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys
 145 150 155 160

Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala
 165 170 175

Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp
 180 185 190

Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr
 195 200 205

ES 2 599 953 T3

Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe
 210 215 220

Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val
 225 230 235 240

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

Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser
 260 265 270

Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp
 275 280 285

Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Ser Ala Ala Ile Asp Pro Glu Asn
 290 295 300

Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr
 305 310 315 320

Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe
 325 330 335

Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn
 340 345 350

Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val
 355 360 365

Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn
 370 375 380

Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp
 385 390 395 400

Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe
 405 410 415

Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln
 420 425 430

Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr
 435 440 445

ES 2 599 953 T3

Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu
450 455 460

Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg
465 470 475 480

Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser
485 490 495

Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro
500 505 510

Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
515 520

<210> 5

<211> 520

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Regiones de dominio A ClfA N1 N2 N3 con alteraciones (ClfA P336A Y338S)

10

<400> 5

ES 2 599 953 T3

Ser Glu Asn Ser Val Thr Gln Ser Asp Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys
1 5 10 15

Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala Ala Pro Lys Thr Asp Asp Thr
20 25 30

Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Ser Ser Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr
35 40 45

Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser
50 55 60

Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr
65 70 75 80

Thr Thr Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe
100 105 110

Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr
115 120 125

ES 2 599 953 T3

Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr
 130 135 140

Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys
 145 150 155 160

Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala
 165 170 175

Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp
 180 185 190

Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr
 195 200 205

Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe
 210 215 220

Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val
 225 230 235 240

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

Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser
 260 265 270

Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp
 275 280 285

Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Ala Ala Ser Ile Asp Pro Glu Asn
 290 295 300

Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr
 305 310 315 320

Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe
 325 330 335

Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn
 340 345 350

Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val
 355 360 365

ES 2 599 953 T3

Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn
 370 375 380

Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp
 385 390 395 400

Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe
 405 410 415

Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln
 420 425 430

Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr
 435 440 445

Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu
 450 455 460

Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg
 465 470 475 480

Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser
 485 490 495

Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro
 500 505 510

Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
 515 520

<210> 6
 <211> 530
 5 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> Región A rClfA natural con residuos en terminales N y C adicionales

10
 <400> 6

His His His His His His Gly Ser Ser Glu Asn Ser Val Thr Gln Ser
 1 5 10 15

Asp Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30

Ala Ala Pro Lys Thr Asp Asp Thr Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Ser
 35 40 45

ES 2 599 953 T3

Ser Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln
50 55 60

Gln Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr
65 70 75 80

Pro Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr Thr Thr Thr Asn Gln Ala Asn Thr
85 90 95

Pro Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn
100 105 110

Gln Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser
115 120 125

Val Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr
130 135 140

Gln Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro
145 150 155 160

Gln Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn
165 170 175

Thr Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala
180 185 190

Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val
195 200 205

Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly
210 215 220

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

Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly
245 250 255

Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val
260 265 270

Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe
275 280 285

ES 2 599 953 T3

Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met
 290 295 300

Pro Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr
 305 310 315 320

Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val
 325 330 335

Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr
 340 345 350

Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr
 355 360 365

Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn
 370 375 380

Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr
 385 390 395 400

Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser
 405 410 415

Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn
 420 425 430

Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro
 435 440 445

Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile
 450 455 460

Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly
 465 470 475 480

Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val
 485 490 495

Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val
 500 505 510

Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
 515 520 525

Lys Leu
530

<210> 7

<211> 530

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Región A rClfAPYI natural con residuos en terminales N y C adicionales

10

<400> 7

ES 2 599 953 T3

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

ES 2 599 953 T3

Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val
 195 200 205
 Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly
 210 215 220
 Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys
 225 230 235 240
 Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly
 245 250 255
 Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val
 260 265 270
 Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe
 275 280 285
 Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Lys Ala Thr Leu Thr Met
 290 295 300
 Ser Ala Ala Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr
 305 310 315 320
 Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val
 325 330 335
 Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr
 340 345 350
 Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr
 355 360 365
 Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn
 370 375 380
 Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr
 385 390 395 400
 Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser
 405 410 415
 Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn
 420 425 430

ES 2 599 953 T3

Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro
 435 440 445

Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile
 450 455 460

Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly
 465 470 475 480

Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val
 485 490 495

Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val
 500 505 510

Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
 515 520 525

Lys Leu
 530

<210> 8

<211> 530

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Región A rCifAPYII natural con residuos en terminales N y C adicionales

10

<400> 8

His His His His His His Gly Ser Ser Glu Asn Ser Val Thr Gln Ser
 1 5 10 15

Asp Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30

Ala Ala Pro Lys Thr Asp Asp Thr Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Ser
 35 40 45

Ser Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln
 50 55 60

Gln Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr
 65 70 75 80

Pro Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr Thr Thr Thr Asn Gln Ala Asn Thr
 85 90 95

ES 2 599 953 T3

Pro Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn
100 105 110

Gln Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser
115 120 125

Val Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr
130 135 140

Gln Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro
145 150 155 160

Gln Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn
165 170 175

Thr Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala
180 185 190

Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val
195 200 205

Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly
210 215 220

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

Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly
245 250 255

Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val
260 265 270

Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe
275 280 285

Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met
290 295 300

Ala Ala Ser Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr
305 310 315 320

Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val
325 330 335

ES 2 599 953 T3

Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr
 340 345 350
 Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr
 355 360 365
 Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn
 370 375 380
 Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr
 385 390 395 400
 Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser
 405 410 415
 Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn
 420 425 430
 Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro
 435 440 445
 Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile
 450 455 460
 Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly
 465 470 475 480
 Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val
 485 490 495
 Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val
 500 505 510
 Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
 515 520 525
 Lys Leu
 530

<210> 9

<211> 339

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Residuos rClfA 221-559

10

<400> 9

ES 2 599 953 T3

Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu
1 5 10 15

Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His
20 25 30

Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser
35 40 45

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

Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly
65 70 75 80

Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile
85 90 95

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr
100 105 110

Leu Thr Met Pro Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly
115 120 125

Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr
130 135 140

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

Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln
165 170 175

Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu
180 185 190

Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln
195 200 205

Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu
210 215 220

Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn
225 230 235 240

ES 2 599 953 T3

Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe
245 250 255

Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn
260 265 270

Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr
275 280 285

Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp
290 295 300

Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp
305 310 315 320

Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro
325 330 335

Ile Pro Glu

<210> 10

<211> 349

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Residuos rClfA 221 a 559 con residuos en terminales N y C adicionales

10

<400> 10

ES 2 599 953 T3

His His His His His His Gly Ser Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala
1 5 10 15

Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp
20 25 30

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

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

Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala
65 70 75 80

Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val
85 90 95

ES 2 599 953 T3

Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn
100 105 110

Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro Ala Tyr Ile Asp
115 120 125

Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile
130 135 140

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

Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp
165 170 175

Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly
180 185 190

Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr
195 200 205

Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr
210 215 220

Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro
225 230 235 240

Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn
245 250 255

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

Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys
275 280 285

Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile
290 295 300

Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly
305 310 315 320

Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro
325 330 335

ES 2 599 953 T3

Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu Lys Leu
 340 345

<210> 11
 <211> 339
 5 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> PY rClfA 221 a 559
 10
 <400> 11

Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu
 1 5 10 15

 Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His
 20 25 30

 Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser
 35 40 45

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

 Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly
 65 70 75 80

 Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile
 85 90 95

 Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr
 100 105 110

 Leu Thr Met Ser Ala Ala Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly
 115 120 125

 Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr
 130 135 140

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

 Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln
 165 170 175

 Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu
 180 185 190

ES 2 599 953 T3

Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln
 195 200 205

Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu
 210 215 220

Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn
 225 230 235 240

Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe
 245 250 255

Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn
 260 265 270

Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr
 275 280 285

Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp
 290 295 300

Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp
 305 310 315 320

Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro
 325 330 335

Ile Pro Glu

<210> 12
 <211> 349
 5 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> PY rClfA 221 a 559 con residuos en terminales N y C adicionales

10
 <400> 12

His His His His His His Gly Ser Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala
 1 5 10 15

Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp
 20 25 30

Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn

ES 2 599 953 T3

Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile
 290 295 300

Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly
 305 310 315 320

Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro
 325 330 335

Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu Lys Leu
 340 345

<210> 13

<211> 321

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Residuos rClfA 221 a 531 con residuos en terminales N y C adicionales (truncamiento cerradura delta)

10

<400> 13

His His His His His His Gly Ser Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala
 1 5 10 15

Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp
 20 25 30

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

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

Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala
 65 70 75 80

Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val
 85 90 95

Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn
 100 105 110

Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro Ala Tyr Ile Asp
 115 120 125

ES 2 599 953 T3

Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile
 130 135 140

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

Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp
 165 170 175

Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly
 180 185 190

Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr
 195 200 205

Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr
 210 215 220

Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro
 225 230 235 240

Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn
 245 250 255

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

Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys
 275 280 285

Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile
 290 295 300

Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Arg
 305 310 315 320

Ser

<210> 14

<211> 311

5 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Residuos rClfA 221 a 531 (truncamiento cerradura delta)

10

<400> 14

ES 2 599 953 T3

Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu
1 5 10 15

Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His
20 25 30

Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser
35 40 45

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

Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly
65 70 75 80

Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile
85 90 95

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr
100 105 110

Leu Thr Met Pro Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly
115 120 125

Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr
130 135 140

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

Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln
165 170 175

Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu
180 185 190

Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln
195 200 205

Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu
210 215 220

Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn
225 230 235 240

ES 2 599 953 T3

Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe
245 250 255

Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn
260 265 270

Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr
275 280 285

Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp
290 295 300

Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn
305 310

REIVINDICACIONES

1. Un factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de acuerdo con SEQ ID NO. 1 o una secuencia con al menos el 85%, preferentemente al menos el 95% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO. 1 o un fragmento de la misma que comprende al menos los residuos de aminoácidos 221 a 531 de la región de unión a fibrinógeno (Región A), **caracterizado por** al menos una sustitución o delección de residuo de aminoácido en el residuo de aminoácido Ala254, Tyr256, Pro336, Tyr338, Ile387, Lys389, Glu526 y/o Val527 para producir una proteína de unión a fibrinógeno recombinante con capacidad reducida o que carece de la capacidad de unirse de forma no covalente a fibrinógeno que estimula una mayor respuesta inmunitaria que la proteína ClfA natural, para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas.
2. El factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante o un fragmento del mismo para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas de acuerdo con la reivindicación 1 donde la infección es una infección por *Staphylococcus aureus*.
3. El factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante o un fragmento del mismo para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas de acuerdo con la reivindicación 1 donde la infección es una sepsis, artritis séptica y/o endocarditis.
4. El factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante o un fragmento del mismo para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante o un fragmento del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO. 3, 6, 9, 10 y 13 o secuencias con al menos el 85%, preferentemente al menos el 95% de identidad de secuencia con una secuencia de SEQ ID NO: 3, 6, 9, 10 y 13 con al menos una sustitución o delección de residuo de aminoácido en los residuos de aminoácidos Ala254, Tyr256, Pro336, Tyr338, Ile387, Lys389, Glu526 y/o Val527.
5. El factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante o un fragmento del mismo para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el ClfA o un fragmento del mismo comprende al menos una sustitución de residuo de aminoácido en los residuos de aminoácidos Ala254, Tyr256, Pro336, Tyr338, Ile387, Lys389, Glu526 y/o Val527.
6. El factor de aglutinación (ClfA) estafilocócico recombinante o un fragmento del mismo para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el ClfA o un fragmento del mismo comprende al menos una sustitución de residuo de aminoácido en los residuos de aminoácidos Tyr256, Pro336, Tyr338, Lys389, Glu526 y/o Val527.
7. El factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante o un fragmento del mismo, para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la unión no covalente que tiene lugar durante el proceso de anclaje-llave-cerradura de la proteína en el fibrinógeno se reduce o se evita.
8. El factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la sustitución o delección de aminoácidos reduce la interacción no covalente con fibrinógeno evitando o reduciendo la unión a ligando con la bolsa hidrófoba que separa las subregiones N2 y N3 de la Región A de la proteína de unión a fibrinógeno.
9. El factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el ClfA o un fragmento del mismo comprende la región de unión a fibrinógeno sin los residuos de aminoácidos de péptidos de cerradura.
10. El factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el ClfA o un fragmento del mismo comprende los residuos de aminoácidos Ala254, Tyr256, Pro336, Tyr338, Ile387, Lys389, Glu526 y/o Val527 que están sustituidos por Ala o Ser.
11. El factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la proteína de

unión a fibrinógeno estafilocócica recombinante tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO. 1 y 3 a 14 donde el residuo P₃₃₆ y/o Y₃₃₈ de SEQ ID NO: 1, 3, 6, 9, 10 y 13 están sustituidos por serina y/o alanina para producir rClfAP₃₃₆S Y₃₃₈A o rClfAP₃₃₆A Y₃₃₈S.

- 5 12. El factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el ClfA o un fragmento del mismo comprende la proteína de unión a fibrinógeno, la región de unión a fibrinógeno, la región de unión a fibrinógeno mínima y/o un fragmento de las mismas.
- 10 13. El factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el ClfA o un fragmento del mismo comprende
- Subregiones N1 a N3, que cubren residuos de aminoácidos 40 a 559 de la región de unión a fibrinógeno (Región A);
- 15 o Subregiones N2 y N3, que cubren residuos de aminoácidos 221 a 559 de la región de unión a fibrinógeno de ClfA (Región A).
14. El uso del factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de acuerdo con SEQ ID NO. 1 o una secuencia con al menos el 85%, preferentemente al menos el 95% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO. 1 o un fragmento de la misma que comprende al menos los residuos de aminoácidos 221 a 531 de la región de unión a fibrinógeno (Región A), con al menos una sustitución o delección de residuo de aminoácido en los residuos de aminoácidos Ala254, Tyr256, Pro336, Tyr338, Ile387, Lys389, Glu526 y/o Val527 para producir una proteína de unión a fibrinógeno recombinante con capacidad reducida o que carece de la capacidad de unirse de forma no covalente a fibrinógeno que estimula una mayor respuesta inmunitaria que la proteína ClfA natural en la
- 20 fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas.
15. Una construcción de ácido nucleico, vector de expresión o célula hospedadora que expresa un factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de acuerdo con SEQ ID NO. 1 o una secuencia con al menos el 85%, preferentemente al menos el 95% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO. 1 o un fragmento de la misma que comprende al menos los residuos de aminoácidos 221 a 531 de la región de unión a fibrinógeno (Región A), con al menos una sustitución o delección de residuo de aminoácido en el residuo de aminoácido Ala254, Tyr256, Pro336, Tyr338, Ile387, Lys389, Glu526 y/o Val527 para producir una proteína de unión a fibrinógeno recombinante con capacidad reducida o que carece de la capacidad de unirse de forma no covalente a fibrinógeno que estimula una mayor respuesta inmunitaria que la proteína ClfA natural, para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas.
- 30
- 35
16. Una vacuna que comprende un factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de acuerdo con SEQ ID NO. 1 o una secuencia con al menos el 85%, preferentemente al menos el 95% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO. 1 o un fragmento de la misma que comprende al menos los residuos de aminoácidos 221 a 531 de la región de unión a fibrinógeno (Región A), con al menos una sustitución o delección de residuo de aminoácido en el residuo de aminoácido Ala254, Tyr256, Pro336, Tyr338, Ile387, Lys389, Glu526 y/o Val527 para producir una proteína de unión a fibrinógeno recombinante con capacidad reducida o que carece de la capacidad de unirse de forma no covalente a fibrinógeno que estimula una mayor respuesta inmunitaria que la proteína ClfA natural, para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas.
- 40
- 45
17. Una composición farmacéutica inmunógena que comprende un factor de aglutinación A (ClfA) estafilocócico recombinante de acuerdo con SEQ ID NO. 1 o una secuencia con al menos el 85%, preferentemente al menos el 95% de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO. 1 o un fragmento de la misma que comprende al menos los residuos de aminoácidos 221 a 531 de la región de unión a fibrinógeno (Región A), con al menos una sustitución o delección de residuo de aminoácido en el residuo de aminoácido Ala254, Tyr256, Pro336, Tyr338, Ile387, Lys389, Glu526 y/o Val527 para producir una proteína de unión a fibrinógeno recombinante con capacidad reducida o que carece de la capacidad de unirse de forma no covalente a fibrinógeno que estimula una mayor respuesta inmunitaria que la proteína ClfA natural, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones estafilocócicas.
- 50
- 55

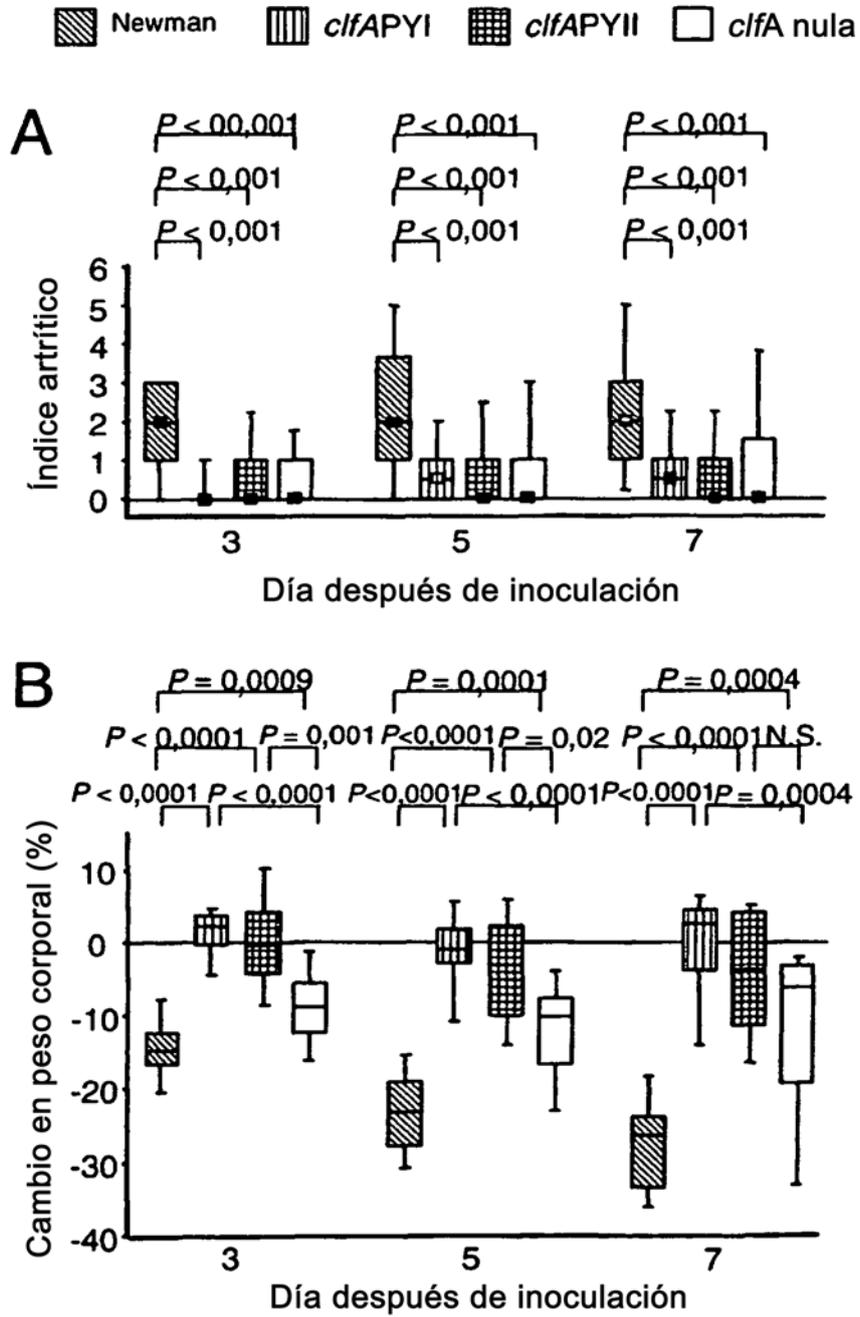


Fig. 1

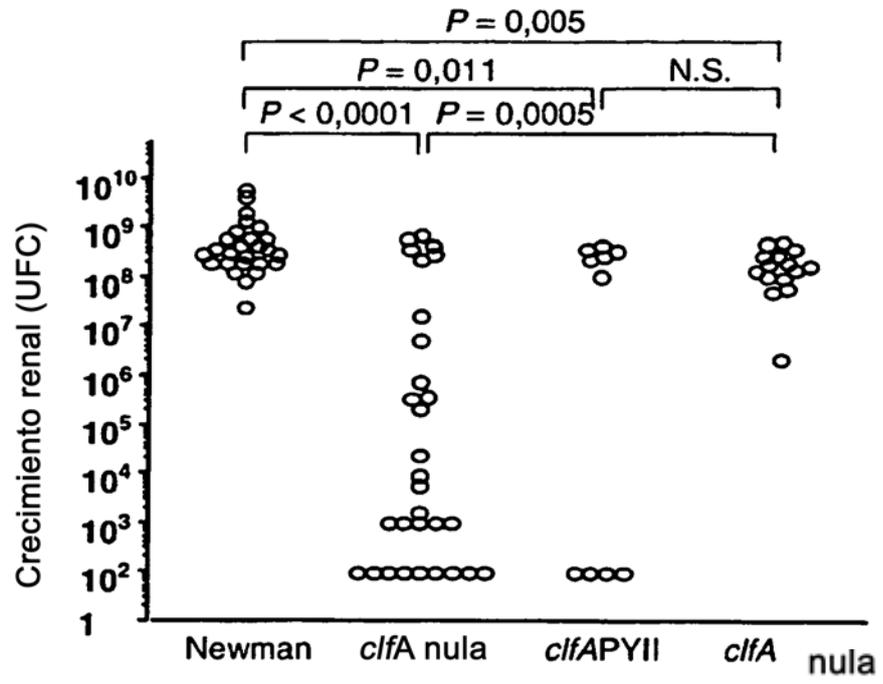


Fig. 2

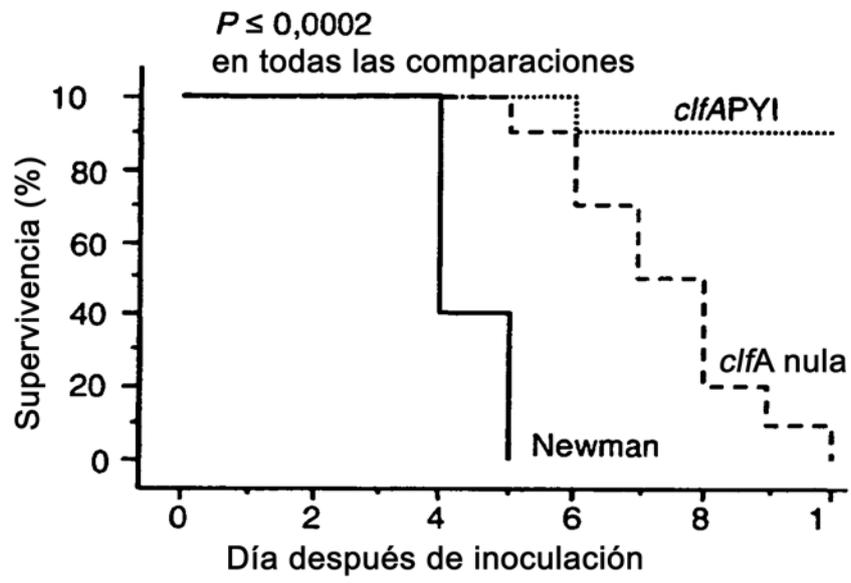


Fig. 3

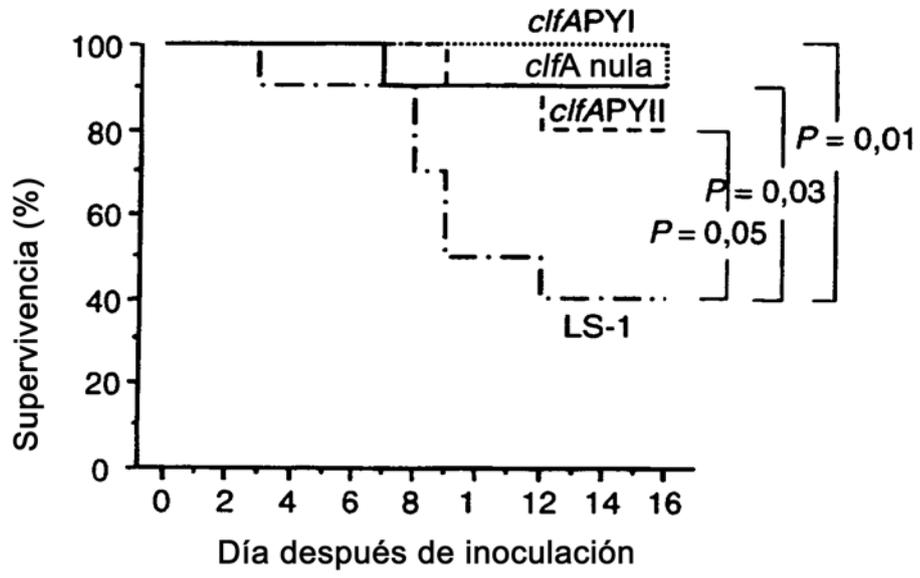


Fig. 4

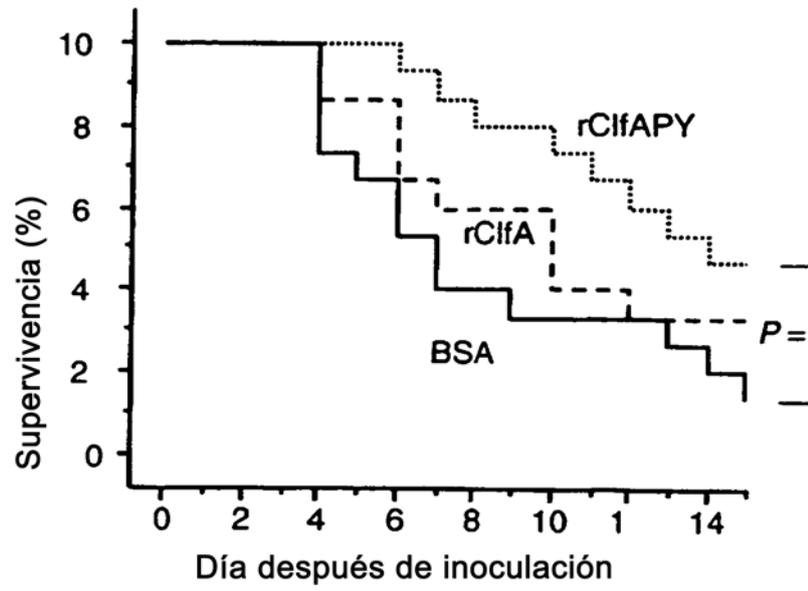


Fig. 5

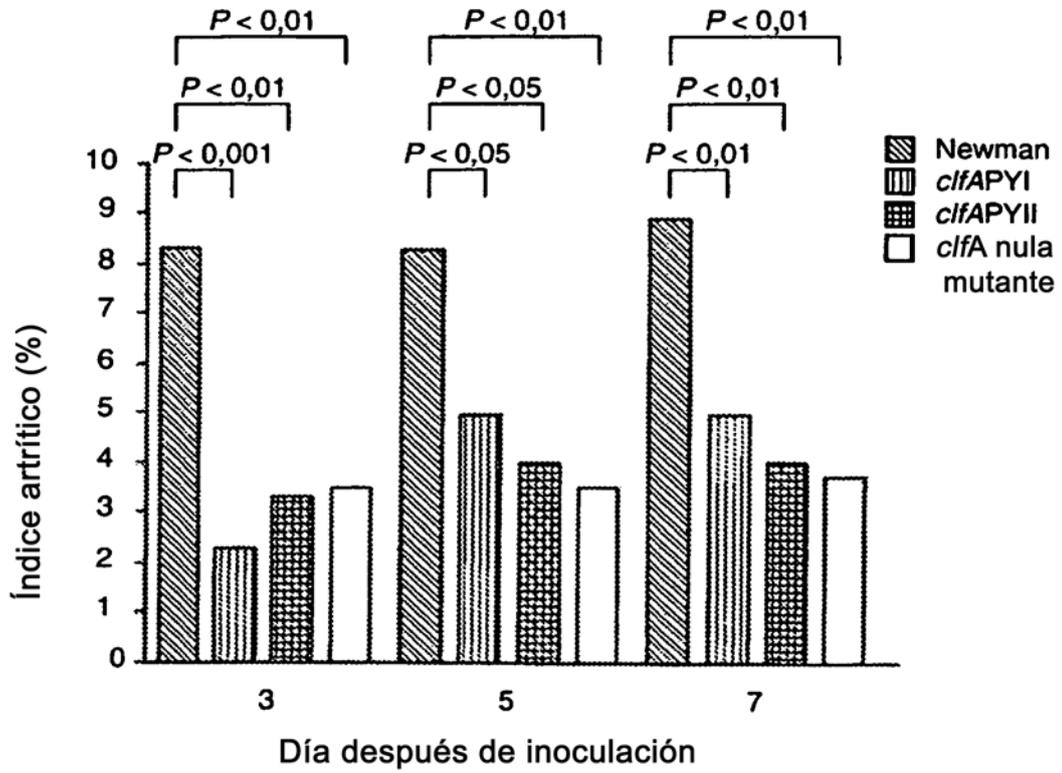


Fig. 6

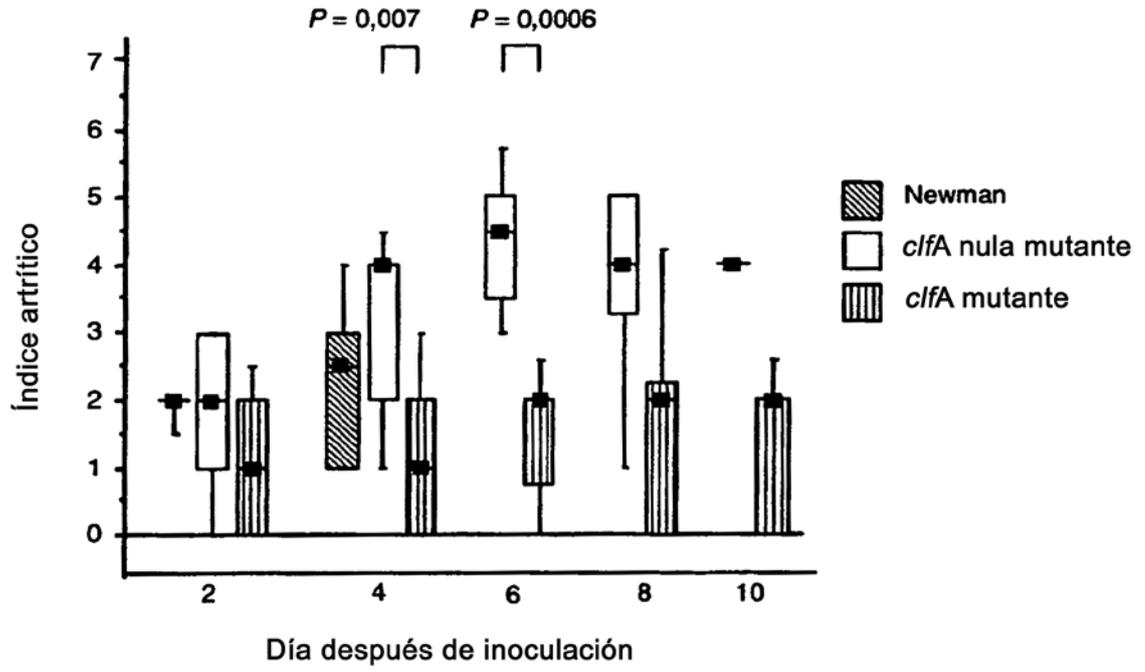


Fig. 7

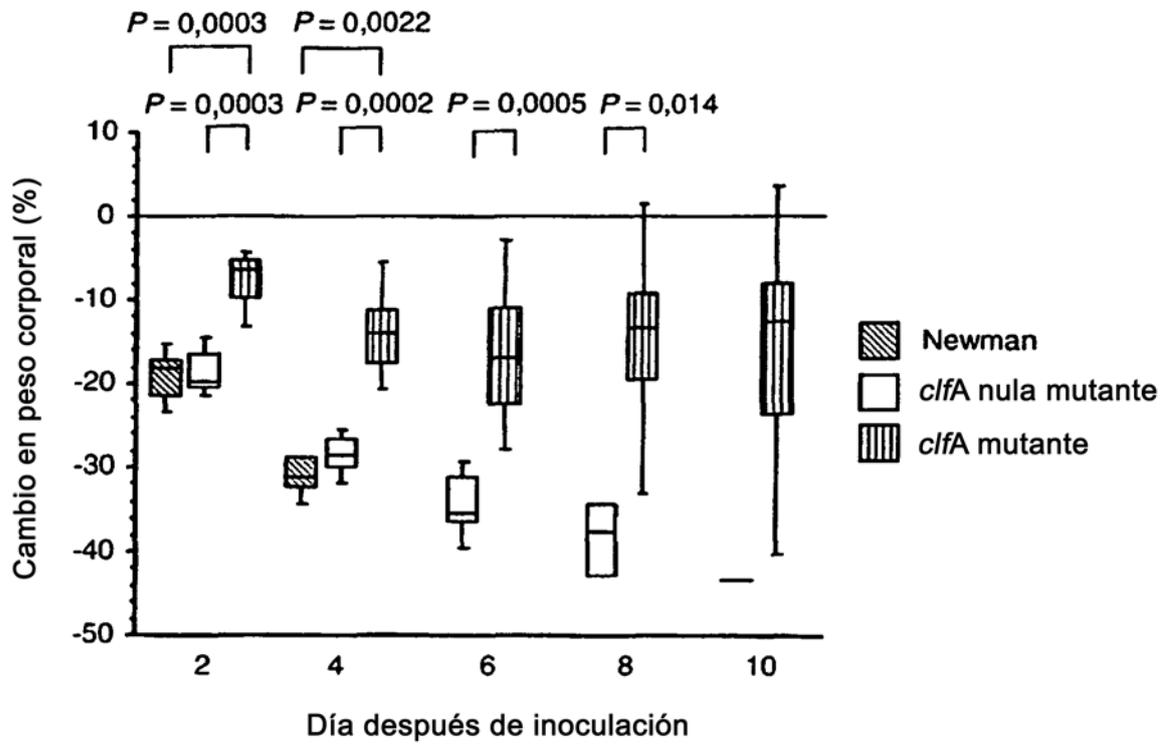


Fig. 8

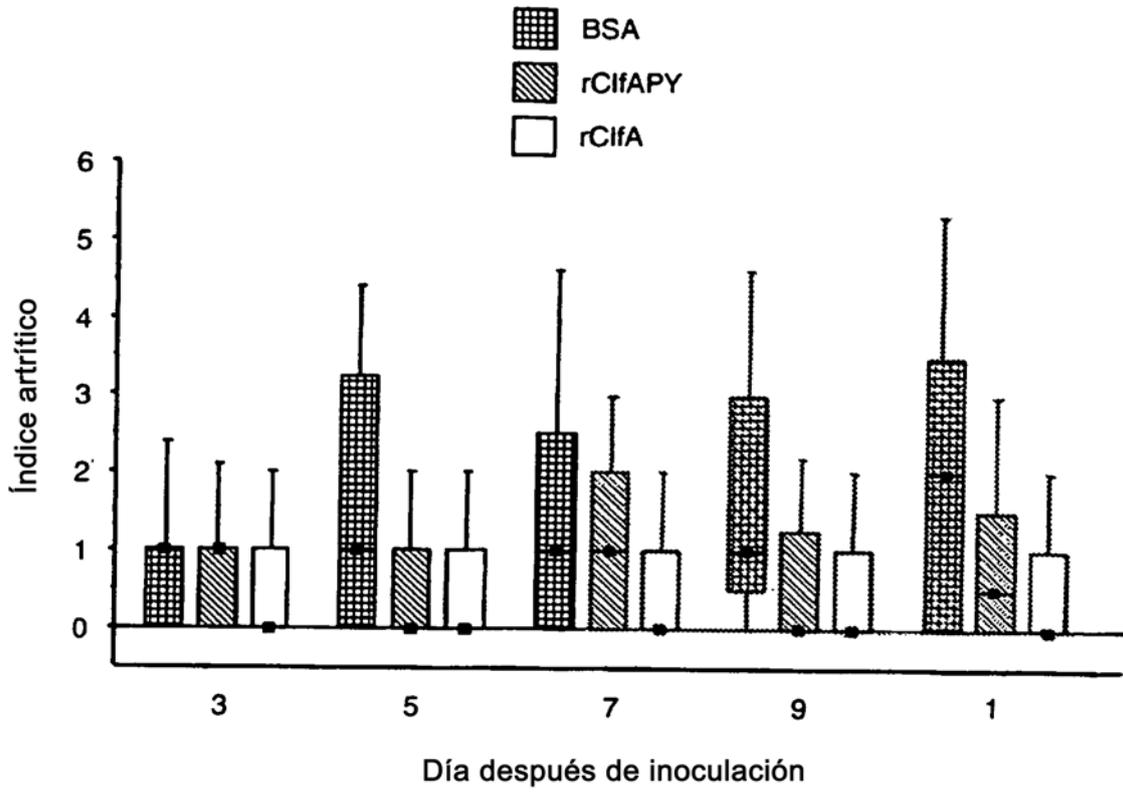


Fig. 9

proteína dominio A (N123) ClfA natural (rClfA)

agtgaaaatagtgttacgcaatctgatagcgcaagtaacgaaagcaaaagtaatgattcaagt
 S E N S V T Q S D S A S N E S K S N D S S
 agcgttagtgctgcacctaataaacagacgacacaaaacgtgagtgataactaaaacatcgtca
 S V S A A P K T D D T N V S D T K T S S
 aacactaataatggcgaaacgagtggtggcgcaaaatccagcacaacaggaacgacacaa
 N T N N G E T S V A Q N P A Q Q E T T Q
 tcatcatcaacaaatgcaactacggaagaaacgccggttaactggggaagctactactacg
 S S S T N A T T E E T P V T G E A T T T
 acaacgaatcaagctaatacaccggcaacaactcaatcaagcaatacaaatgccggaggaa
 T T N Q A N T P A T T Q S S N T N A E E
 ttagtgaatcaacaagtaatgaaacgacttttaatgataactaatacagtatcatctgta
 L V N Q T S N E T T F N D T N T V S S V
 aattcacctcaaaattctacaaatgccgaaaatgttcaacaacgcaagatacttcaact
 N S P Q N S T N A E N V S T T Q D T S T
 gaagcaacaccttcaacaatgaatcagctccacagagtacagatgcaagtaataaagat
 E A T P S N N E S A P Q S T D A S N K D
 gtagttaatcaagcgggtaatacaagtgcgctagaatgagagcatttagtttagcggca
 V V N Q A V N T S A P R M R A F S L A A
 gtagctgcagatgcaccggcagctggcacagatattacgaatcagttgacgaatgtgaca
 V A A D A P A A G T D I T N Q L T N V T
 gttggattgactctggtacgactgtgtatccgcaccaagcagggttatgtcaaacgtaat
 V G I D S G T T V Y P H Q A G Y V K L N
 tatggttttcagtgccctaattctgctgtaaaagtgacacattcaaaataactgtacct
 Y G F S V P N S A V K G D T F K I T V P
 aaagaattaaacttaaatgggtgtaacttcaactgctaaagtgccaccaattatggcctgga
 K E L N L N G V T S T A K V P P I M A G
 gatcaagattggcaaatgggtgtaatcgatagtgatggtaatgattttatacatttaca
 D Q V L A N G V I D S D G N V I Y T F T
 gactatgtaaaactaaagatgatgtaaaagcaactttgaccatgccccgcttatattgac
 D Y V N T K D D V K A T L T M A I D
 cctgaaaaatgtaaaaagacaggtaatgtgacattggctactggcataggtagtaaca
 P E N V K K T G N V T L A T G I G S T T
 gcaaacaaaacagattagtagattatgaaaaatagggtaagttttataacttatctatt
 A N K T V L V D Y E K Y G K F Y N L S I
 aaaggtacaattgaccaaactcgataaaacaaataatcgtatcgtcagacaatttatgtc
 K G T I D Q I D K T N N T Y R Q T I Y V
 aatccaagtgagataacggttatggcgccggttttaacaggttaatttaaaaccaaatacg
 N P S G D N V I A P V L T G N L K P N T
 gatagtaatgcattaatagatcagcaaaatacaagtaataaagtaataaagtagataat
 D S N A L I D Q Q N T S I K V Y K V D N
 gcagctgatttatctgaaagttactttgtgaaatccagaaaactttgaggatgtcactaat
 A A D L S E S Y F V N P E N F E D V T N
 agtgtgaatattacattcccaaatccaaatcaatataaagtagagtttaatacgcctgat
 S V N I T F P N P N Q Y K V E F N T P D
 gatcaaaattacaacaccgtatagtagttgtaaatgggtcatattgatccgaatagcaaa
 D Q I T T P Y I V V V N G H I D P N S K
 ggtgatttagctttacggttcaactttataggggtataactcgaatataaattggcgctct
 G D L A L R S T L Y G Y N S N I I W R S
 atgtcatgggacaacgaagtagcatttaataacggatcagggttctggtgacggatcgat
 M S W D N E V A F N N G S G S G D G I D
 aaaccagttgttccctgaacaacctgatgagcctgggtgaaattgaaccaattccagag
 K P V V P E Q P D E P G E I E P I P E

Fig. 10

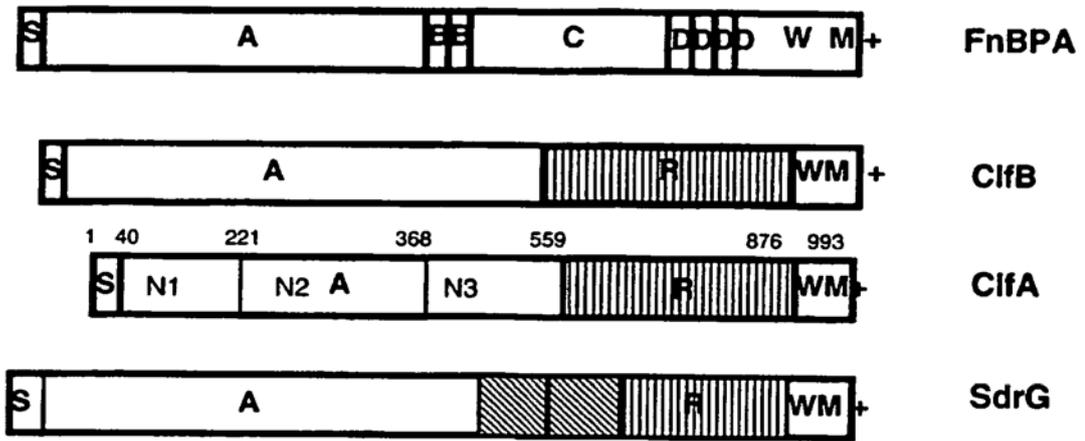


Fig. 11

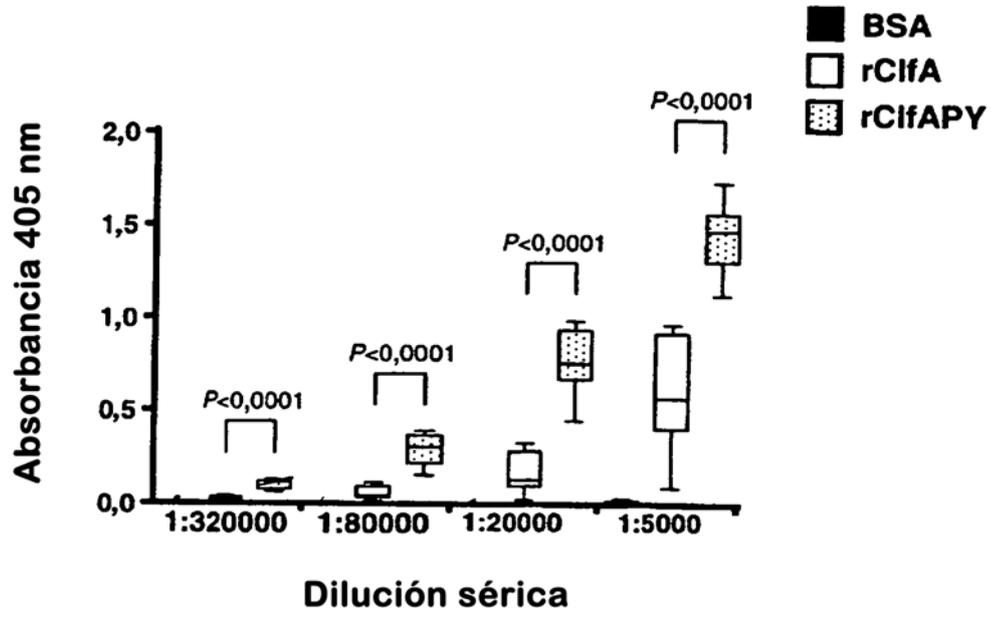


Fig. 12

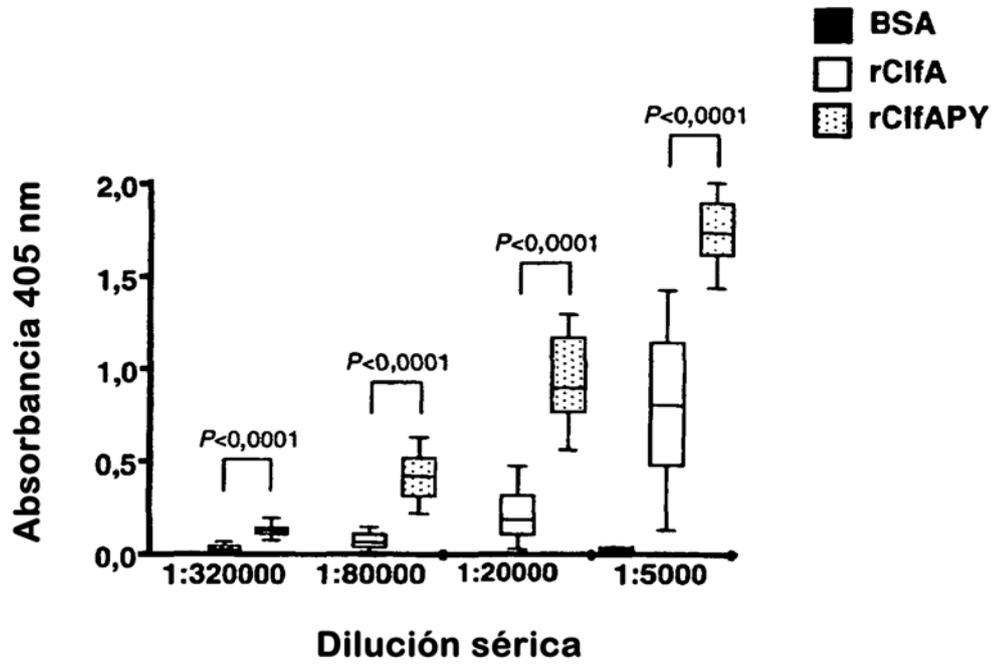


Fig. 13

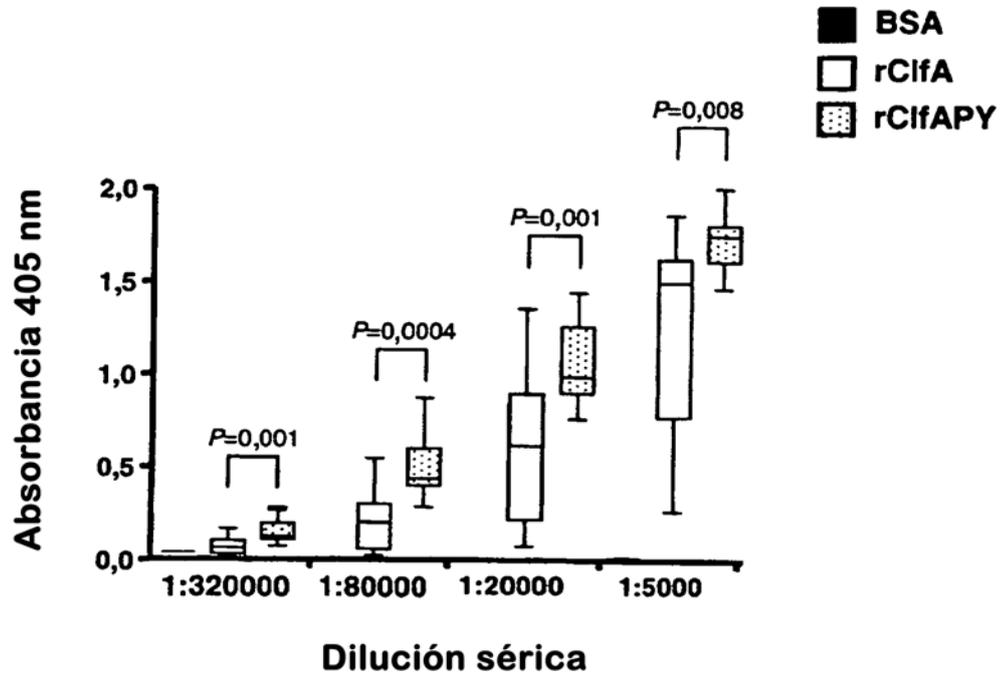


Fig. 14

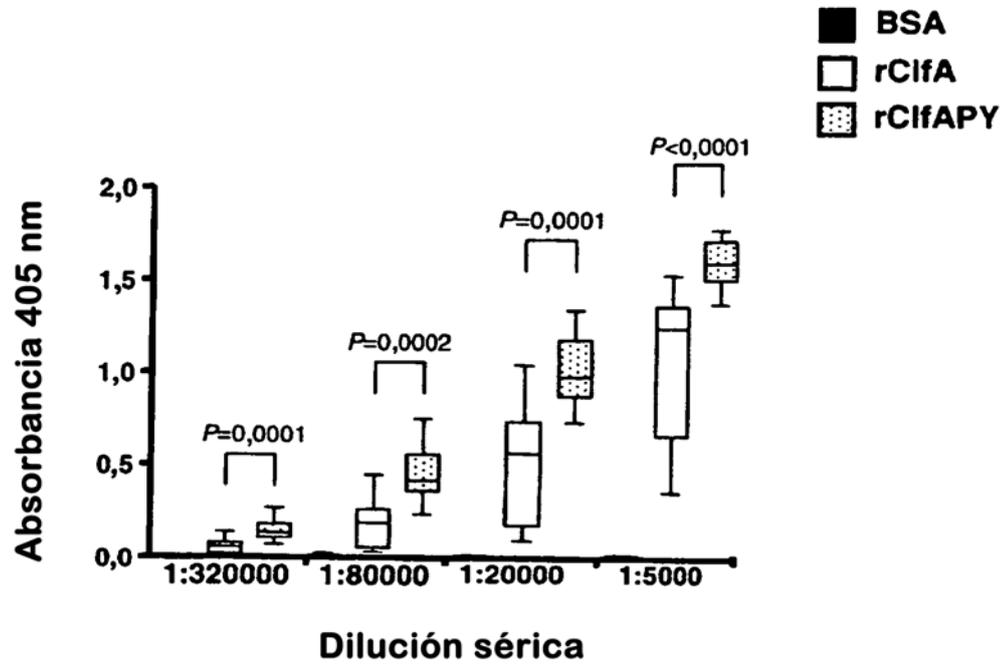


Fig. 15

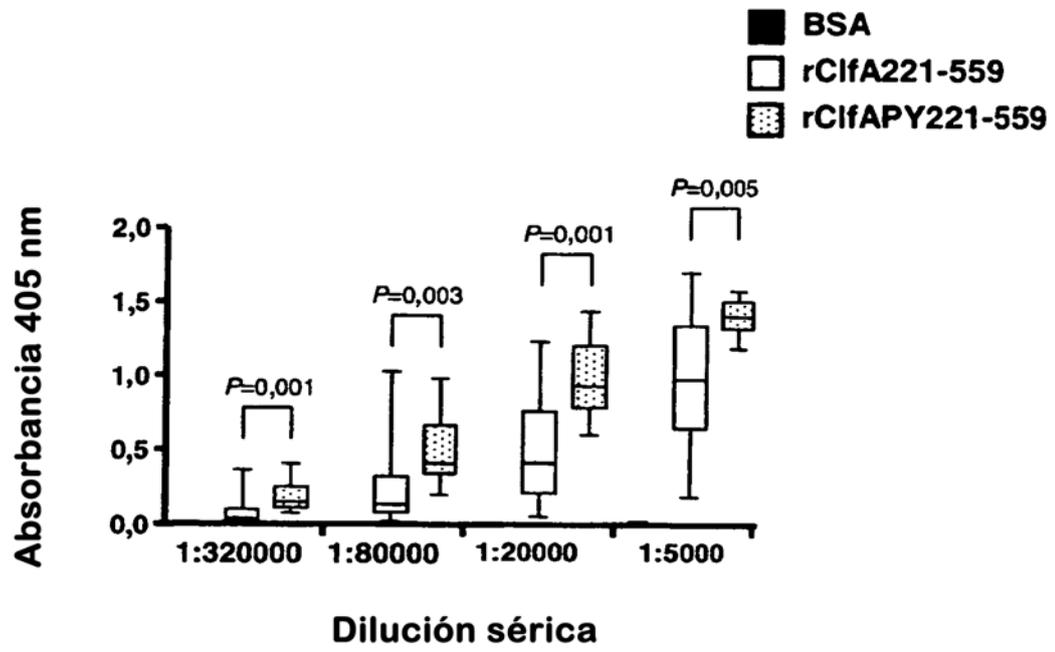


Fig. 16

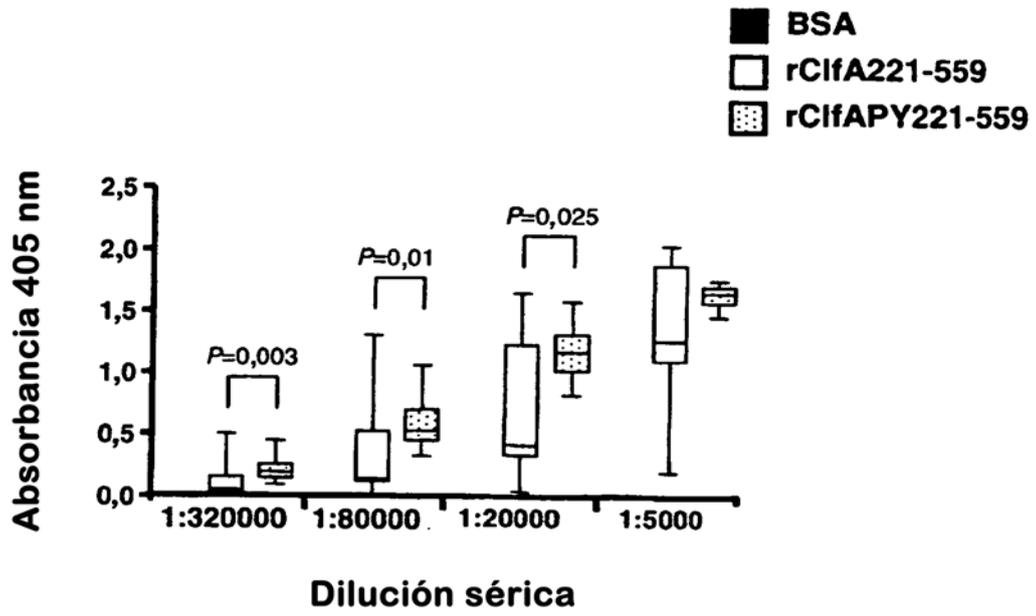


Fig. 17

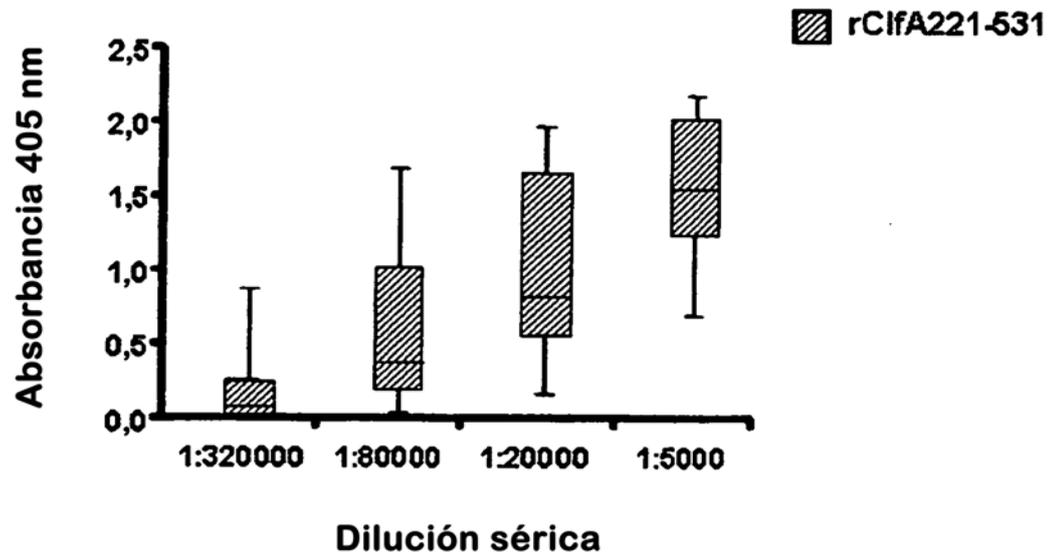


Fig. 18