

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 017**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2011 PCT/US2011/035033**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011 WO11140114**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2011 E 11778188 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2566891**

54 Título: **Inmunización pasiva anti-glucosaminidasa para infecciones por Staphylococcus aureus**

30 Prioridad:

03.05.2010 US 330568 P

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

17.03.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF ROCHESTER (100.0%)
601 Elmwood Avenue Box OTT
Rochester, NY 14642, US**

72 Inventor/es:

**SCHWARZ, EDWARD, M.;
SULLIVAN, MARK, A. y
DAISS, JOHN, L.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 606 017 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

Immunización pasiva anti-glucosaminidasa para infecciones por *Staphylococcus aureus*

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos n.º de serie 61/330.568, presentada el 3 de mayo de 2010.

Campo de la invención

- 10 La presente invención se refiere a la inmunización pasiva contra infección por *Staphylococcus aureus*, particularmente para la prevención o tratamiento de la osteomielitis y para la implantación de un implante ortopédico o injerto. Pueden usarse para estos fines anticuerpos que se unen específicamente a glucosaminidasa de *S. aureus* y composiciones farmacéuticas que contienen los mismos.

15 Antecedentes de la invención

- Hay una gran necesidad de novedosas intervenciones de osteomielitis crónica (OM) dado que se producen aproximadamente 112.000 infecciones al año en Estados Unidos relacionadas con dispositivos ortopédicos, a un coste hospitalario aproximado de 15.000-70.000 dólares por incidente (Darouiche, "Treatment of Infections Associated With Surgical Implants", N. Engl. J. Med. 350(14): 1422-9 (2004)). A pesar de que las mejoras en la técnica quirúrgica y la profilaxis con antibióticos agresivos han disminuido la tasa de infección después de la cirugía de implante ortopédico en un 1-5 %, la osteomielitis (OM) sigue siendo un problema grave y parece estar en aumento en la cirugía mínimamente invasiva (Mahomed et al., "Rates and Outcomes of Primary and Revision Total Hip Replacement in the United States Medicare Population", J. Bone Joint Surg. Am. 85(A-1): 27-32 (2003); WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance, 2001). La importancia de este resurgimiento, un 80 % del cual se debe a *Staphylococcus aureus*, se amplifica por el hecho de que ~50 % de los aislados clínicos son *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA). Aunque las tasas de infección para las prótesis articulares y los dispositivos de fijación de fracturas han sido únicamente del 0,3-11 % y el 5-15 % de los casos, respectivamente, durante la última década (Lew y Waldvogel, "Osteomyelitis", Lancet 364(9431): 369-79 (2004); Toms et al., "The Management of Peri-Prosthetic Infection in Total Joint Arthroplasty", J. Bone Joint Surg. Br. 88(2): 149-55 (2006)), este resultado puede llevar a la amputación o la muerte. Además, la popularización de la "cirugía mínimamente invasiva" para el reemplazo articular total electivo (TJR) en la que la incisión muy pequeña a menudo conduce a complicaciones de la prótesis en contacto con la piel durante la implantación, ha aumentado notablemente la incidencia de OM (Mahomed et al., "Rates and Outcomes of Primary and Revision Total Hip Replacement in the United States Medicare Population", J. Bone Joint Surg. Am. 85(A-1): 27-32 (2003); WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance, 2001). Estas infecciones requieren una cirugía de revisión en dos fases muy costosa, e informes recientes sugieren que las tasas de éxito podrían ser tan bajas como del 50 % (Azzam et al., "Outcome of a Second Two-stage Reimplantation for Periprosthetic Knee Infection", Clin. Orthop. Relat. Res. 467(7): 1706-14 (2009)). Sin embargo, la mayor preocupación es la aparición de cepas resistentes a los fármacos, sobre todo MRSA, que ha superado al VIH como el patógeno más letal en América del Norte, y continúa haciendo la gestión de la OM crónica más difícil, planteando una gran demanda de intervenciones terapéuticas novedosas. Hay una gran necesidad de estrategias de intervención alternativas, en particular para ancianos inmunodeprimidos que son los principales receptores de TJR.

- 45 En la actualidad, no existen tratamientos profilácticos que puedan proteger a los pacientes de alto riesgo contra MRSA, sobre todo los nacidos durante el "baby boom" que representan la mayor parte de los 1,5 millones de TJR realizados anualmente en Estados Unidos. Una vacuna que disminuirá la incidencia de SARM en un 50-80 % no sólo reducirá la complicación principal del reemplazo de articulaciones y los procedimientos de reparación de fracturas abiertas, sino que también reducirá la carga sanitaria en una cantidad similar.

- 50 Los estudios han documentado que el 80 % de la OM crónica es causada por *S. aureus*. Estas bacterias contienen varios factores que los convierten en patógenos óseos, incluyendo varias moléculas de adhesión que facilitan su unión a la matriz ósea (Flock et al., "Cloning and Expression of the Gene for a Fibronectin-Binding Protein From *Staphylococcus aureus*", Embo. J. 6(8): 2351-7 (1987)), toxinas capaces de estimular la resorción ósea (Nair et al., "Surface-Associated Proteins From *Staphylococcus aureus* Demonstrate Potent Bone Resorbing Activity", J. Bone Miner. Res. 10(5): 726-34 (1995)), a través de una actividad de osteoclasto aumentada (Marriott et al., "Osteoblasts Express the Inflammatory Cytokine Interleukin-6 in a Murine Model of *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis and Infected Human Bone Tissue", Am. J. Pathol. 164(4):1399-406 (2004)). La etapa limitante de la velocidad en la evolución y persistencia de la infección es la formación de una biopelícula alrededor de los dispositivos implantados (Costerton et al., "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections", Science 284(5418): 1318-22 (1999)). Poco después de la implantación, se forma en la superficie del implante una capa de acondicionamiento compuesta de adhesinas derivadas del huésped (incluyendo fibrinógeno, fibronectina y colágeno) e invita a la adherencia de bacterias libremente flotantes derivadas de la siembra hematológica, incluyendo la propagación de la infección desde una región contigua (La piel adyacente a una herida), la inoculación quirúrgica de bacterias en el hueso o el traumatismo coincidente con una interrupción significativa de la envoltura ósea de tejido blando asociada (Darouiche, "Treatment of Infections Associated With Surgical Implants", N. Engl. J. Med. 350(14): 1422-9 (2004)).

En los siguientes días, la división celular bacteriana, el reclutamiento de organismos planctónicos adicionales y la secreción de productos bacterianos (como el glicocálix) produce la biopelícula. Esta biopelícula sirve como una barrera dominante para proteger las bacterias de la acción de antibióticos, células fagocíticas, anticuerpos y deteriora las funciones de los linfocitos (Gray et al., "Effect of Extracellular Slime Substance From Staphylococcus epidermidis on the Human Cellular Immune Response", *Lancet* 1(8373): 365-7 (1984); Johnson et al., "Interference With Granulocyte Function By Staphylococcus epidermidis Slime", *Infect. Immun.* 54(1): 13-20 (1986); Naylor et al., "Antibiotic Resistance of Biomaterial-Adherent Coagulase-Negative and Coagulase-Positive Staphylococci", *Clin. Orthop. Relat. Res.* 261: 126-33 (1990)).

Otro descubrimiento reciente es que *S. aureus* no sólo coloniza la matriz ósea, sino que también es internalizada por los osteoblastos *in vitro* (Ellington et al., "Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Staphylococcus aureus Invasion of Normal Osteoblasts", *Infect. Immune.* 69(9): 5235-42 (2001)) e *in vivo* (Reilly et al., "In Vivo Internalization of Staphylococcus aureus by Embryonic Chick Osteoblasts", *Bone* 26(1): 63-70 (2000)). Esto proporciona otra capa de resistencia a los anticuerpos y a los antibióticos. Esta fase de la infección se produce en condiciones de actividad metabólica marcadamente reducida y, a veces, aparece como las denominadas variantes de colonia pequeña que probablemente explica su persistencia (Proctor et al., "Persistent and Relapsing Infections Associated with Small-Colony Variants of Staphylococcus aureus", *Clin. Infect. Dis.* 20(1): 95-102 (1995)). En este punto las bacterias también pueden expresar resistencia fenotípica al tratamiento antimicrobiano, explicando también la alta tasa de fracaso de cursos cortos de terapia (Chuard et al., "Resistance of Staphylococcus aureus Recovered From Infected Foreign Body in Vivo to Killing by Antimicrobials", *J. Infect. Dis.* 163(6): 1369-73 (1991)). Debido a estos mecanismos patógenos extensos, OM es notoria por su tendencia a recurrir incluso después de años de inactividad, y se acepta que una curación completa es un resultado poco probable (Mader y Calhoun, "Long-Bone Osteomyelitis Diagnosis and Management", *Hosp. Pract. (Off Ed)* 29(10): 71-6, 9, 83 passim (1994)).

Una de las preguntas clave en el campo de la OM crónica es por qué el conocimiento actual de los factores que regulan la OM crónica es tan limitado. Supuestamente, las herramientas experimentales necesarias para dilucidar la genética de virulencia bacteriana han estado disponibles durante más de un siglo. Hay tres explicaciones para esta anomalía. En primer lugar, aunque el número total de casos de osteomielitis es alto, su incidencia del 1-5 % es demasiado baja para estudios clínicos prospectivos, con la posible excepción de la artropatía de revisión. En segundo lugar, se conoce bien que los cultivos *in vitro* seleccionan rápidamente el crecimiento de organismos que no elaboran una cápsula extracelular, de tal manera que la biología de biopelícula sólo puede estudiarse con modelos *in vivo*. (Costerton et al., "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections", *Science* 284(5418): 1318-22 (1999)). Esto conduce al "mayor obstáculo" en este campo, que es la ausencia de un modelo animal cuantitativo que pueda evaluar la fase inicial de crecimiento planctónico de las bacterias antes de la formación de la biopelícula. Hasta la fecha, gran parte del conocimiento de su patogénesis proviene de modelos animales (Norden, "Lessons Learned From Animal Models of Osteomyelitis", *Rev. Infect. Dis.* 10(1): 103-10 (1988)), que se han desarrollado para el pollo (Daum et al., "A Model of Staphylococcus aureus Bacteremia, Septic Arthritis, and Osteomyelitis in Chickens", *J. Orthop. Res.* 8(6): 804-13 (1990)), rata (Rissing et al., "Model of Experimental Chronic Osteomyelitis in Rats", *Infect. Immun.* 47(3): 581-6 (1985)), cobaya (Passl et al., "A Model of Experimental Post-Traumatic Osteomyelitis in Guinea Pigs", *J. Trauma* 24(4): 323-6 (1984)), conejo (Worlock et al., "An Experimental Model of Post-Traumatic Osteomyelitis in Rabbits", *Br. J. Exp. Pathol.* 69(2): 235-44 (1988)), perro (Varshney et al., "Experimental Model of Staphylococcal Osteomyelitis in Dogs", *Indian J. Exp. Biol.* 27(9): 816-9 (1989)), oveja (Kaarsemaker et al., "New Model for Chronic Osteomyelitis With Staphylococcus aureus in Sheep", *Clin. Orthop. Relat. Res.* 339: 246-52 (1997)) y mucho más recientemente un ratón (Marriott et al., "Osteoblasts Express the Inflammatory Cytokine Interleukin-6 in a Murine Model of Staphylococcus aureus Osteomyelitis and Infected Human Bone Tissue", *Am. J. Pathol.* 164(4): 1399-406 (2004)). Aunque estos modelos se han utilizado para confirmar la importancia de adhesinas bacterianas identificadas a partir de ensayos *in vitro* (Chuard et al., "Susceptibility of Staphylococcus aureus Growing on Fibronectin-Coated Surfaces to Bactericidal Antibiotics", *Antimicrob. Agents Chemother.* 37(4): 625-32 (1993); Buxton et al., "Binding of a Staphylococcus aureus Bone Pathogen to Type I Collagen", *Microb. Pathog.* 8(6):441-8 (1990); Switalski et al., "A Collagen Receptor on Staphylococcus aureus Strains Isolated From Patients With Septic Arthritis Mediates Adhesion to Cartilage", *Mol. Microbiol.* 7(1): 99-107 (1993)), no tienen una medida de resultado de crecimiento *in vivo*, carga bacteriana u osteólisis. Por lo tanto, no pueden utilizarse eficazmente para evaluar los efectos de los fármacos, los mutantes bacterianos y el papel de los factores del huésped con ratones transgénicos.

Basándose en más de 150 años de investigación, ha surgido un claro paradigma para explicar la patogénesis microbiana. Este modelo también se aplica a OM. El paso inicial de la infección se produce cuando una bacteria unicelular invade el cuerpo. En este punto, el microbio debe responder a los cambios ambientales y expresar los genes de virulencia que le ayudarán a derrotar la inmunidad innata y le proporcionará receptores de adhesina para unirse al huésped. La bacteria también depende de la disponibilidad estocástica de adhesinas huésped a partir de tejido necrótico o un cuerpo extraño tal como un implante. El éxito de estas etapas conduce a una fase de crecimiento exponencial, que cesa en el punto de agotamiento de los nutrientes y/o el desarrollo de la inmunidad adaptativa. Después de la fase de crecimiento exponencial, las bacterias se ven obligadas a persistir en condiciones de crecimiento latentes dentro de la biopelícula. Sin embargo, en este punto la infección es ahora crónica y no puede ser erradicada por los fármacos o la inmunidad del huésped. Por lo tanto, el enfoque en este campo ha sido sobre las adhesinas de superficie celular que interactúan específicamente con componentes de matriz extracelular

conocidos como MSCRAMM (componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesivas) (Patti et al., "MSCRAMM-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues", Annu. Rev. Microbiol. 48: 585-617 (1994)). De hecho, esencialmente todas las vacunas anti-*S. Aureus* que se han desarrollado hasta la fecha se han dirigido contra MSCRAMM que son importantes para la colonización e invasión del tejido huésped. El objetivo de estas vacunas es generar anticuerpos que se unan a estos antígenos de superficie, inhibiendo así su fijación al tejido huésped. Mediante la opsonización de la superficie bacteriana, estos anticuerpos también pueden mediar la depuración de *S. aureus* por células fagocíticas. Desafortunadamente, *S. aureus* tiene muchas adhesinas, de tal manera que la inhibición de una o más puede no ser suficiente para prevenir la unión bacteriana. Además, la depuración bacteriana por células fagocíticas puede estar limitada en el tejido avascular, de modo que el mAb puede necesitar un mecanismo de acción anti-microbiano adicional para reducir significativamente el crecimiento planctónico *in vivo* de *S. aureus* y prevenir el establecimiento de OM crónica o reinfección durante la cirugía de revisión de reemplazo de articulación total.

La presente invención está dirigida a superar estas y otras deficiencias en la técnica.

El documento US 2002/0076766 (D1) describe polipéptidos de glucosaminidasa y polipéptidos de glucosaminidasa de codificación de ADN(ARN) y métodos para producir dichos polipéptidos mediante técnicas recombinantes.

El documento WO 2010/0395363 (D2) describe una vacuna protectora contra biopelículas de *Staphylococcus aureus* que comprende inmunógenos asociados a la pared celular.

El documento WO 2010/028013 (D3) describe el diagnóstico y tratamiento de infecciones por biopelícula *in vivo*.

Brady et al., 2006 (Infection and Immunity 74(6): 3415; D4) describen la identificación de proteínas de *Staphylococcus aureus* reconocidas por la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos a una infección por biopelícula.

Brady et al., 2011 (Infection and Immunity 79(4): 1797; D5) describen la resolución de una infección por biopelícula de *Staphylococcus aureus* usando vacunación y tratamiento antibiótico.

Varrone et al., 2011 (IBMS BoneKEy 8(4): 187; D6) describen anticuerpos monoclonales de anti-glucosaminidasa como una inmunización pasiva para infecciones ortopédicas por *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA).

Varrone et al., 2011 (57th Annual Meeting of the Orthopedic Research Society; D7) evalúan los anticuerpos monoclonales anti-glucosaminidasa como una inmunización pasiva para osteomielitis.

Kates et al., 2011 (European Cells and Materials 21(Supl. 2): 23; D8) describen el desarrollo de una inmunización pasiva para osteomielitis por MRSA.

Garcia-Lara and Foster, 2009 (Curr Opin in Pharmacol 9: 552; D9) revisa el estado actual y los prospectos de la inmunoterapia *anti-Staphylococcus aureus*.

Sumario de la invención

Un primer aspecto de la presente invención está dirigido a un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a una glucosaminidasa de *Staphylococcus aureus* e inhibe el crecimiento *in vivo* de *S. aureus*, en donde el anticuerpo monoclonal o la porción de unión a antígeno del mismo se unen específicamente a un epítipo situado completa o parcialmente en un dominio R3 de la glucosaminidasa de *S. aureus*.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una línea celular que expresa un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno de la presente invención. En una realización, la línea celular es una línea celular de hibridoma. En otra realización, la línea celular es una línea celular recombinante que expresa el anticuerpo.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que puede incluir un vehículo y uno o más anticuerpos monoclonales por porciones de unión a antígeno de la presente invención.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, una porción de unión a antígeno, o una composición farmacéutica de la presente invención para su uso en un método de tratamiento de infección por *S. aureus* en un paciente que tiene una infección por *S. aureus*.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, una porción de unión a antígeno, o una composición farmacéutica de la presente invención para su uso en un método de tratamiento de osteomielitis en un paciente que tiene una infección ósea o articular *S. aureus*.

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, una porción de unión a antígeno o una composición farmacéutica de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía en el que la cirugía comprende introducir un implante ortopédico en un paciente que necesita un implante ortopédico y en el que el implante ortopédico está revestido o tratado con el anticuerpo monoclonal, la porción de unión a antígeno o la composición farmacéutica, antes, durante o inmediatamente después de la implantación. En este aspecto de la presente invención, el anticuerpo monoclonal, la porción de unión a antígeno o la composición farmacéutica actúa como un agente profiláctico. En ciertas realizaciones, este aspecto de la invención está dirigido a prevenir la OM o una reinfección por *S. aureus* durante o posterior a una cirugía de revisión de reemplazo de articulación total.

Debido al *S. aureus*, y en especial las variantes resistentes a los antibióticos, tal como *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), son las causas más comunes y difíciles de las infecciones por *Staphylococcus*, los usos de la presente invención tienen el objetivo de alterar etapas críticas en el ciclo de crecimiento de estos microorganismos. La presente invención también se refiere a una inmunización pasiva para prevenir las infecciones en los pacientes, por ejemplo, pacientes que se someten al reemplazo articular total. El destino seleccionado para la inmunización es la glucosaminidasa (Gmd) que *S. aureus* secreta para facilitar la citocinesis, la separación de las células durante la mitosis (Oshida et al., "A Staphylococcus aureus Autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase Domain and an Endo-beta-N-acetylglucosaminidase Domain: Cloning, Sequence Analysis, and Characterization", Proc Natl Acad Sci U S A 92: 285-9 (1995); Oshida et al., "Expression Analysis of the Autolysin Gene (atl) of Staphylococcus aureus", Microbial Immunol 42: 655-9 (1998); Sugai et al., "Localized Perforation of the Cell Wall by a Major Autolysin: atl Gene Products and the Onset of Penicillin-induced Lysis of Staphylococcus aureus", J Bacteriol 179: 2958-62 (1997); y Yamada et al., "An Autolysin Ring Associated with Cell Separation of Staphylococcus aureus", J Bacteriol 178: 1565-71 (1996)). Para estudiar y evaluar infecciones por *S. aureus*, OM y diversas terapias dirigidas a infecciones por *Staphylococcus*, se usó un modelo murino novedoso de OM asociado a implante en el que un clavo de acero inoxidable está revestido con *S. aureus* e implantado por vía transcortical a través de la metafísica tibial (Li et al., "Quantitative Mouse Model of Implant-Associated Osteomyelitis and the Kinetics of Microbial Growth, Osteolysis, and Humoral Immunity", J. Orthop. Res. 26(1): 96-105 (2008)). Este modelo proporciona OM altamente reproducible con una biopelícula Gram-positiva, osteólisis, formación de secuestro/involucro, y se asemeja estrechamente a la OM clínica. Además, se usó formación de imágenes por bioluminiscencia *in vivo* para cuantificar la fase de crecimiento planctónicas de las bacterias; se usó PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) para determinar el número de copias del gen *nuc* en el tejido óseo infectado para cuantificar la carga bacteriana total; y se usó micro-CT para cuantificar la osteólisis.

Usando el modelo murino que se ha mencionado anteriormente de osteomielitis, se han identificado anticuerpos específicos para Gmd como una parte visible de la respuesta inmune de éxito en los ratones estimulados. Además, una vacuna que comprende Gmd recombinante con His₆ N-terminal (Gmd-His) provocó al menos una inmunidad parcial en el modelo de ratón. Los anticuerpos anti-Gmd pueden bloquear la división celular de *S. aureus* ya sea bloqueando directamente la división celular o reclutando efectores huésped, tales como fagocitos, o complementar en un punto vulnerable en el ciclo de la división celular.

Los experimentos que demuestran la acción de los anticuerpos monoclonales individuales en el crecimiento celular de *S. aureus* se presentan en detalle en los ejemplos adjuntos. El objetivo específico fue determinar si los anticuerpos individuales, en ausencia de cualquier efector inmune, suprimirán o alterarán el crecimiento de *S. aureus* de división rápida. El aumento relacionado con el crecimiento en la dispersión de la luz por los cultivos crecientes de *S. aureus* Xen29 se redujo en cinco anticuerpos monoclonales seleccionados, pero no pareció alterar en realidad la tasa de crecimiento *in vitro* de por sí. Más bien, parecen haber reducido la actividad de Gmd en un grado tal que las células en división no pudieron separarse unas de otras. El efecto fue dependiente de la dosis y compatible con una interacción de alta afinidad entre cada anticuerpo y Gmd. Estos efectos demuestran que estos anticuerpos, dirigidos contra Gmd recombinante, reaccionan eficazmente con la Gmd nativa y disminuyen su actividad enzimática. Uno de los anticuerpos monoclonales, 1C11, demostró la capacidad única para promover la lisis independiente de las células de *S. aureus*, y dos anticuerpos monoclonales, 1C11 y 3A8, demostraron una capacidad para inhibir el crecimiento de *S. aureus in vivo* y la infección durante la cirugía de implante ortopédico en un modelo de ratón *in vivo*.

Se aprecia que en esta divulgación, y particularmente en la reivindicaciones y/o párrafos, los términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado que se le atribuye en la ley de Patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y que expresiones tales como "que consiste básicamente en" y "consiste básicamente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de Patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no mencionados explícitamente, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-C muestran la cuantificación de la osteólisis de osteomielitis asociada a implante. Una serie longitudinal de rayos X de un ratón representativo demuestra el desarrollo de osteólisis asociada a implante en el

tiempo en este modelo (figura 1A). Vistas medias de imágenes de μ CT (tomografía microcomputerizada) reconstruidas de tibias representativas de ratones (N = 5) que recibieron un clavo trans-tibial revestido con *S. aureus* y se sacrificaron el día indicado (figura 1B). También se muestran ratones de control que recibieron un clavo trans-tibial revestido con *S. aureus* y tratados con gentamicina parenteral (Gent), o recibieron un clavo estéril. El área osteolítica en torno al clavo se cuantificó como se ha descrito previamente (Li et al., "Quantitative Mouse Model of Implant-Associated Osteomyelitis and the Kinetics of Microbial Growth, Osteolysis, and Humoral Immunity", J. Orthop. Res. 26(1): 96-105 (2008), y los datos se presentan como la media +/- DE (* $p < 0,05$ frente a Día 4; ** $p < 0,05$ frente a Gent Día 18) (figura 1C). No había ninguna diferencia en el área de osteólisis entre los controles de gentamicina y el clavo estéril.

Las figuras 2A-H muestran la histología de la OM asociada a implante trans-tibial. H&E (Tinción de Hematoxilina y Eosina) (figuras 2A-C), TRAP (fosfatasa ácida resistente a tartrato) (figuras 2D-F) y secciones teñidas con Gram (figuras 3G y 3H) de histología en el sitio del clavo (*) adyacente al córtex tibial (#), 9 días después del implante de un clavo estéril (figuras 2A, 2D y 2G), o un revestido con *S. aureus* (figuras 2B, 2C, 2E, 2F y 2H). Ha de apreciarse que el nuevo hueso (h) que se forma en torno al clavo estéril (figura 2A, 2D y 2G) frente al secuestro necrótico (s) e involucro (i) adyacente al clavo infectado. Mientras que muy pocos osteoclastos TRAP+ (puntas de flecha de color amarillo) estaban presentes en las muestras no infectadas (figura 2D), numerosos osteoclastos parecen estar reabsorbiendo activamente el córtex adyacente al clavo infectado, y remodelando el nuevo hueso tejido que reviste el involucro (figuras 2E y 2F). La tinción Gram confirmó la ausencia de bacterias en los especímenes con el clavo estéril (figura 2G) y su presencia (puntas de flecha de color negro) en el hueso necrótico alrededor de los clavos infectados.

Las figuras 3A-C muestran la correlación inversa entre la carga bacteriana y la inmunidad humoral contra los antígenos de *S. aureus* durante el establecimiento de la osteomielitis crónica. Se realizó un estudio de transcurso de tiempo en el que a los ratones se les dio un clavo transcortical infectado que contenía 1×10^6 UFC de *S. aureus* en sus tibias y se sacrificaron el día indicado. En el sacrificio, el ADN se purificó de la tibia infectada y el análisis por RTQ-PCR se realizó para determinar los valores de Ct para *S. aureus nuc*. Usando una curva estándar mostrada, este número se convirtió en los genes *nuc* recuperables por tibia. Para controlar la integridad de las muestras, el gen *nuc* recuperable por el valor de la tibia se estandarizó con respecto al valor de Ct para la β -actina de ratón para cada muestra. A partir de esta conversión, la carga bacteriana se derivó como "Copias del gen *Nuc/Tibia*". Los datos de cada ratón se muestran en la figura 3A como un punto individual, y la media +/- DE para cada punto temporal (n = 5) se presenta en la figura 3B. Para evaluar el desarrollo de anticuerpos específicos de anti-*S. aureus* durante el establecimiento de OM, se tomó suero de cada ratón en el grupo que se sacrificó el día 18, antes de la infección (día 0) y los 4, 7, 11, 14 y 18 después de la infección. Este suero se usó como el anticuerpo principal en transferencias Western de extracto de *S. aureus* total que después se sondaron con anticuerpos conjugados con HRP que son específicos para IgG de ratón como se muestra en la figura 3C. Los datos muestran que hay un aumento estable del crecimiento bacteriano del día 0 al día 11, cuando el primer huésped desarrolla anticuerpos específicos contra las bacterias. Según el título de los anticuerpos anti-*S. aureus* aumenta, la carga bacteriana disminuye, lo que sugiere que los anticuerpos son protectores. Las transferencias de Western también identifican claramente cuatro antígenos inmunodominantes de 26, 34, 38 y 56 kDa (flechas). También se ha demostrado que Xen 29 induce anticuerpos contra las mismas proteínas 26, 34, 38 y 56 kDa.

Las figuras 4A-C muestran que la glucosaminidasa de autolisina de *S. aureus* es el antígeno inmunodominante de 56 kDa. Para elucidar la identidad molecular de los antígenos de *S. aureus* novedosos identificados en la figura 3, se realizó un análisis de inmunotransferencia sustractivo de 2D-SDS-PAGE de extracto de célula completa con suero pre-inmune e inmune del día 14. Tres geles 2D se realizaron después de enfoque isoelectrónico (pH 4,0-10,0). El primero se tiñó en azul de Coomassie (figura 4A). Los otros se sometieron a transferencia Western con suero del día 0 (figura 4B) o el día 14 (figura 4C). Además de la reactividad de fondo, el suero inmune detectó un polipéptido específico (~53 kDa; pH 9: flecha). El punto de 53 kDa se eliminó del gel de Coomassie, se digirió con tripsina, y se analizó por MALDI, que resolvió 70 picos peptídicos individuales. La secuencia de aminoácido de cada péptido tenía una correspondencia del 100 % con la secuencia conocida de la glucosaminidasa de autolisina de *S. aureus*, que es de 53,6 kDa y tiene un pI de 9,66.

Las figuras 5A-B muestran la cuantificación por imagen bioluminiscente (BLI) del crecimiento bacteriano durante el establecimiento de osteomielitis crónica. La figura 5A muestra los niveles de BLI ($p/s/cm^2/sr$) en el sitio de infección y se evaluó longitudinalmente en ratones que recibieron un clavo trans-tibial estéril (no infectado), o un clavo revestido con Xen 29 *S. aureus* (infectado) y se diagnosticaron por imagen el día indicado. El círculo en la imagen de color izquierda superior destaca la región de interés (ROI) de 1,5 cm de diámetro que se evaluó para determinar la BLI en cada ratón en cada punto temporal. La figura 5B muestra los datos de ratones (N = 5) que estaban Sin infectar, Infectados o se infectaron y se trataron con antibióticos parenterales (Gentamicina) y se evaluaron para determinar la BLI longitudinalmente en el momento indicado tras la cirugía. Los datos se presentan como la media +/- DE (* Significativamente mayor frente al Día 0; $p < 0,05$).

Las figuras 6A-B muestran que ELISA anti-Gmd funcional demostró la eficacia de la vacuna de Gmd recombinante. La figura 6A muestra ELISA en suero en el que His-Gmd se usó como el antígeno para ensayar títulos de anticuerpo anti-Gmd en suero de ratón que se generó usando un anti-suero de alto título conocido de ratones infectados con *S. aureus*. El factor de dilución seriada (eje X) y la lectura de absorbancia a 450 nm (eje Y) de las muestras de suero diluidas 2 veces en serie se representan gráficamente en el plano XY usando el software GraphPad Prism 4. El título funcional (1:3623) se extrapola a partir del punto de inflexión (flecha) de la curva de dilución. La figura 6B muestra el análisis ELISA usado para determinar los títulos de anticuerpos anti-Gmd en los sueros de pre-inmunización de ratones, refuerzo previo y pre-estimulación con la vacuna indicada.

Ha de apreciarse que únicamente los ratones inmunizados con la vacuna His-Gmd obtuvieron altos títulos.

Las figuras 7A-C muestran que la vacuna de His-Gmd recombinante protege a los ratones de OM asociada a implante. Los ratones (n = 20) se estimularon con un clavo transtibial infectado con Xen29 como se describe en los Ejemplos adjuntos, BLI se realizó el día 3, y los ratones se sometieron a eutanasia para análisis RT-qPCR de *nuc* el día 11. Se muestra una imagen de la BLI de un ratón representativo en el Grupo 1 y 3 (figura 7A), y la media +/- DE se presenta para mostrar la BLI de reducción significativa (figura 7B). Esto se traduce en un descenso significativo en los genes *nuc* amplificables (media +/- DE) el día 11 (figura 7C).

La figura 8 muestra el crecimiento *in vitro* de *S. aureus* Xen29 en presencia de anticuerpos monoclonales anti-Gmd (mAb anti-Gmd). Se incubaron 100 ufc de Xen29 de un cultivo en crecimiento en fase logarítmica a 37 °C con anticuerpos monoclonales anti-Gmd 1C11, 1E12, 2D11, y 3A8, 50 µg/ml en medio LB. El crecimiento se monitorizó por dispersión de la luz tanto a 670 como 490 nm en los intervalos indicados. MOPC21 es el anticuerpo de control apareado con isotipo.

La figura 9 muestra el efecto dependiente de la dosis del mAb 1C11 anti-Gmd sobre el crecimiento *in vitro* de *S. aureus*. Se incubaron 100 ufc de Xen29 de un cultivo en crecimiento en fase logarítmica a 37 °C con un intervalo de concentraciones de mAb 1C11 anti-Gmd en medio LB. El crecimiento se controló por dispersión de la luz tanto a 670 como 490 nm a los intervalos indicados.

La figura 10 muestra el efecto del mAb de control MOPC21 sobre el crecimiento *in vitro* de *S. aureus*. Se incubaron 100 ufc de Xen29 de un cultivo en crecimiento en fase logarítmica a 37 °C con un intervalo de concentraciones de anticuerpo monoclonal de control apareado con isotipo MOPC21 en medio LB. El crecimiento se monitorizó por dispersión de la luz tanto a 670 como 490 nm a los intervalos indicados. Ha de apreciarse que la ligera elevación de la línea de 50 µg/ml se debe al uso de pocillos externos en la placa de microtitulación donde las temperaturas se equilibran más rápidamente.

La figura 11 muestra un alineamiento de secuencia aminoacídica ClustalW de las secuencias V_H de los hibridomas 2D11, 3H6, 1E12 y 3A8. (2D11 V_H = SEQ ID NO: 1; 3H6 V_H = SEQ ID NO: 2; 1E12 V_H = SEQ ID NO: 3; 3A8 V_H = SEQ ID NO: 4). Las secuencias destacadas indican las supuestas regiones determinantes de complementariedad (CDR) en 2D11. Una secuencia consenso (SEQ ID NO: 31) se deriva de estas secuencias de hibridoma.

La figura 12 muestra un alineamiento de secuencia aminoacídica ClustalW de las secuencias V_L de los hibridomas 1E12 y 2D11 (1E12 V_L = SEQ ID NO: 10; 2D11 V_L = SEQ ID NO: 8). Una secuencia consenso (SEQ ID NO: 32) se deriva de estas dos secuencias de hibridoma.

La figura 13 muestra un alineamiento de secuencia aminoacídica ClustalW de las secuencias V_H de los hibridomas 2D11, 3H6, 1E12, 3A8, y 1C11 (2D 11 V_H = SEQ ID NO: 1; 3H6 V_H = SEQ ID NO: 2; 1E12 V_H = SEQ ID NO: 3; 3A8 V_H = SEQ ID NO: 4; 1C11 V_H = SEQ ID NO: 5). Una secuencia consenso (SEQ ID NO: 6) se deriva de estas cinco secuencias de hibridoma.

Las figuras 14A-B muestran un alineamiento de la secuencia aminoacídica ClustalW de las secuencias V_L. La figura 14A muestra el alineamiento V_L de los hibridomas 1E12, 2D11, 3A8, 3H6, y 1C11 (1E12 V_L = SEQ ID NO: 10; 2D11 V_L = SEQ ID NO: 8; 3A8 V_L = SEQ ID NO: 11; 3H6 V_L = SEQ ID NO: 9; 1C11 V_L = SEQ ID NO: 12). Una secuencia consenso (SEQ ID NO: 13) se deriva de estas cinco secuencias de hibridoma. La figura 14B muestra un alineamiento V_L de los hibridomas 1E12, 2D11, 3A8, y 3H6 (1E12 V_L = SEQ ID NO: 10; 2D11 V_L = SEQ ID NO: 8; 3A8 V_L = SEQ ID NO: 11; 3H6 V_L = SEQ ID NO: 9). Una secuencia consenso (SEQ ID NO: 33) se deriva de estas cuatro secuencias de hibridoma.

La figura 15 muestra un alineamiento de la secuencia amino ClustalW de las secuencias V_H de los hibridomas 3A8 y 1C11 (3A8 V_H = SEQ ID NO: 4; 1C11 V_H = SEQ ID NO: 5). Una secuencia consenso (SEQ ID NO: 7) se deriva de estas dos secuencias de hibridoma.

La figura 16 muestra un alineamiento de secuencia aminoacídica ClustalW de las secuencias V_L de los hibridomas 3A8 y 1C11 (3A8 V_L = SEQ ID NO: 11; 1C11 V_L = SEQ ID NO: 12). Una secuencia consenso (SEQ ID NO: 14) se deriva de estas dos secuencias de hibridoma.

La figura 17A ilustra un alineamiento del dominio V_H 1C11 (SEQ ID NO: 5) con una secuencia aminoacídica homóloga (SEQ ID NO: 19) codificada por el gen humano IGV7-81 (véase el Acceso al Genbank AAH32733 y BC032733). Se muestra una secuencia consenso para los homólogos V_H (SEQ ID NO: 34). La figura 17B ilustra un alineamiento del dominio 1C11 V_L (SEQ ID NO: 12) con una secuencia aminoacídica homóloga (SEQ ID NO: 20) codificada por el gen humano IGVK6D-21 (véase el Acceso al Genbank AAA58917 y M29469). Se muestra una secuencia consenso para los homólogos V_L (SEQ ID NO: 35).

La figura 18 muestra la inhibición de His-Gmd (Gmd) de *S. aureus* y después lisozima de huevo de gallina (HEL) por los cinco anticuerpos monoclonales anti-Gmd con MOPC21 como un control negativo apareado a isotipo. La concentración del anticuerpo en µg/ml se enumera en el eje x; la inhibición de la actividad enzimática en el porcentaje (%) se enumera en el eje Y. Los cinco mAb anti-Gmd (1C11, 1E12, 2D11, 3A8, y 3H6) inhiben la actividad de Gmd, pero no tienen ningún efecto sobre la actividad de HEL, y MOPC21 (control negativo) no inhibe ninguna enzima.

La figura 19 muestra la inhibición de Gmd nativa por los cinco mAb anti-His-Gmd 1C11, 1E12, 2D11, 3A8, y 3H6. Cada anticuerpo se añadió a una concentración de 100 µg/ml. Los cinco son inhibidores potentes e inhiben la enzima nativa a aproximadamente el mismo grado que inhiben el Gmd-His recombinante. El control del anticuerpo apareado con isotipo (IgG1) MOPC21 no tuvo ningún efecto sobre la actividad enzimática de Gmd.

Las figuras 20A-D son imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de *S. aureus* cultivado en ausencia (figuras 20A-B) o presencia de anticuerpos monoclonales anti-Gmd de la presente invención. La figura 20C muestra los efectos de 50 µg/ml de mAb 1E12 sobre Xen29 *S. aureus* y la figura 20D muestra los efectos de

50 µg/ml de mAb 1C11 sobre Xen29 *S. aureus*. Se obtuvieron micrógrafos de campos representativos a 50.000 x (A&C), 2.000 x (B) y 4.000 x (D). Las flechas identifican los sitios donde se produjo la lisis y documentan los sorprendentes e inesperados efectos de la presente invención, ya que la actividad lítica del complemento e independiente de las células efectoras inmunes de un mAb anti-*S. aureus* aún no se ha documentado en la bibliografía.

Las figuras 21A-C muestran que la inmunización pasiva con el anticuerpo monoclonal 3A8 inhibe el crecimiento de *S. aureus in vivo* y protege a los ratones de osteomielitis asociada a implante. Los ratones se sometieron a formación de imágenes para evaluar la bioluminiscencia los días 0, 3, 5, 7, 11, y 14, y las imágenes con el mapa de calor de BLI de un animal representativo en cada grupo se muestran en la figura 21A. Las imágenes BLI el día 3 para cada ratón en el estudio se muestran con la media para cada grupo (figura 21B, p = 0,02). Los rayos X de un animal representativo en cada grupo obtenido el día 14 se muestran para ilustrar la lesión osteolítica (flecha) en el ratón de placebo, que no estaba presente en los animales tratados con anti-Gmd (figura 21 C).

Las figuras 22A-C muestran que la inmunización pasiva con el anticuerpo monoclonal 1C11 inhibe el crecimiento de *S. aureus in vivo* y protege a los ratones de osteomielitis asociada a implante. Los ratones se sometieron a formación de imágenes para evaluar la bioluminiscencia los días 0, 3, 5, 7, 10, y 14, y las imágenes con el mapa de calor de BLI de un animal representativo en cada grupo se muestran en (figura 22A). Los valores de BLI el día 3 para cada ratón en el estudio se muestran con la media para cada grupo (figura 22B). Los rayos X de un animal representativo en cada grupo obtenidos el día 14 se muestran para ilustrar la lesión osteolítica (flecha) en el ratón de placebo, que no estaba presente en el ratón tratado con anti-Gmd (figura 22C).

La figura 23 es un gráfico que compara la actividad inhibidora anti-Gmd del 1C11 monoclonal de ratón con el monoclonal quimérico humano:ratón derivado de 1C11. La IgG1 quimérica humana:ratón de 1C11 (h1C11) conserva la capacidad de inhibir His-Gmd. El porcentaje de inhibición de la actividad de His-Gmd sobre el eje Y se muestra en función de la dilución de la preparación de anticuerpo en el eje X. La concentración de 1C11 de ratón era de 10 µg/ml; la concentración de h1C11 quimérico no era conocida para el ensayo mostrado.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una glucosaminidasa de *Staphylococcus aureus* e inhibe el crecimiento *in vivo* de *S. aureus*, en el que el anticuerpo se une a un epítipo completa o parcialmente dentro del dominio R3 de glucosaminidasa de *Staphylococcus aureus*. El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede ser de tal forma que se dirige a *S. aureus* que es resistente a la meticilina.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" pretende incluir inmunoglobulinas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes, así como porciones inmunorreactivas (es decir, porciones de unión a antígeno) de las inmunoglobulinas. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden existir en, o pueden aislarse en diversas formas incluyendo, por ejemplo, anticuerpos monoclonales sustancialmente puros, fragmentos de anticuerpo o porciones de unión, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos humanizados (Ed Harlow y David Lane, USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)).

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención están caracterizados por la unión a glucosaminidasa de *S. aureus* o fragmentos de la misma. Estos anticuerpos se unen específicamente un epítipo inmunodominante en la subunidad de glucosaminidasa (Gmd) de autolisina de *S. aureus* (*Atl*). Estos anticuerpos monoclonales inhiben el crecimiento *in vivo* de *S. aureus*.

El antígeno inmunodominante es una parte del determinante antigénico que se reconoce más fácilmente por el sistema inmune y, por lo tanto, ejerce la mayor influencia sobre la especificidad del anticuerpo inducido. Un "epítipo inmunodominante" se refiere al epítipo en un antígeno que provoca selectivamente una respuesta inmune en un organismo huésped a la exclusión sustancial de otros epítipos en este antígeno.

Normalmente, el antígeno probablemente lleva un epítipo inmunodominante que puede identificarse seleccionando los antígenos en la superficie exterior del organismo patógeno. Por ejemplo, los organismos más simples, tales como los hongos, bacterias y virus tienen una o dos proteínas que se exponen en la superficie exterior del organismo patógeno. Estas proteínas de la superficie externa tienen más probabilidades de llevar el antígeno apropiado. Las proteínas más propensas a portar un epítipo inmunodominante se pueden identificar en un ensayo Western en el que la proteína total se ejecuta en un gel contra suero de un organismo infectado con el organismo patógeno. Los anticuerpos unidos del suero se identifican mediante anticuerpos marcados, tal como en una de las técnicas ELISA bien conocidas. El epítipo inmunodominante se puede identificar examinando el suero de un organismo huésped infectado con el organismo patógeno. El suero se evalúa por su contenido de anticuerpos que se unen a los antígenos identificados que son propensos a causar una respuesta inmune en un organismo huésped. Si existe un epítipo inmunodominante en estos antígenos, sustancialmente todos los anticuerpos en el suero se unirán al epítipo inmunodominante, con poca unión a otros epítipos presentes en el antígeno.

Atl es una de las hidrolasas de peptidoglicano catalíticamente distintas en *S. aureus* que se requiere para digerir la pared celular durante la mitosis (Baba y Schneewind, "Targeting of Muralytic Enzymes to the Cell Division Site of Gram-Positive Bacteria: Repeat Domains Direct Autolysin to the Equatorial Surface Ring of *Staphylococcus aureus*",

EMBO. J. 17(16): 4639-46 (1998)). Además de ser un gen esencial para el crecimiento, los estudios de microscopía electrónica de barrido han demostrado que los anticuerpos anti-*Atl* ligados a *S. aureus* durante la fisión binaria se localizan en regiones de las bacterias que no están cubiertas por la pared celular (Yamada et al., "An Autolysin Ring Associated With Cell Separation of *Staphylococcus aureus*", J. Bacteriol. 178(6): 1565-71 (1996)).

La enzima *Atl* se compone de una amidasa (62 kD) y una glucosaminidasa (53 kD), que se producen a partir de la misma proteína precursora *Atl* mediante un proceso de escisión (Baba y Schneewind, "Targeting of Muralytic Enzymes to the Cell Division Site of Gram-Positive Bacteria: Repeat Domains Direct Autolysin to the Equatorial Surface Ring of *Staphylococcus aureus*", Embo. J. 17(16): 4639-46 (1998); Komatsuzawa et al., "Subcellular Localization of the Major Autolysin, ATL and Its Processed Proteins in *Staphylococcus aureus*", Microbiol Immunol. 41: 469-79 (1997); Oshida et al., "A *Staphylococcus aureus* Autolysin That Has an N-acetylmuramoyl-L-alanine Amidase Domain and an Endo-beta-N-acetylglucosaminidase Domain: Cloning, Sequence Analysis, and Characterization", Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 92(1): 285-9 (1995)). La autolisina se mantiene en la pared celular mediante tres dominios R1, R2 y R3 de unión a la pared celular de ~150 aminoácidos. En la etapa de maduración final, la escisión proteolítica separa el dominio aminidasa y sus dominios R1 y R2 asociados de la glucosaminidasa y su dominio R3 N-terminal asociado.

A modo de ejemplo, una glucosaminidasa de *Staphylococcus aureus* a modo de ejemplo contiene la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 36 a continuación.

```

AYTVTKPQTT  QTVSKIAQVK  PNNTGIRASV  YEKTAKNGAK  YADRTFYVTK
ERAHGNETYV  LLNNTSHNIP  LGWFENVKDLN  VQNLGKEVKT  TQKYTVNKS
NGLSMVPWGT  KNQVILTGN  IAQGTFNATK  QVSVGKDVYL  YGTINNRTGW
VNAKDLTAPT  AVKPTTSAK  DYNPTYVIKN  GNGYYYVTPN  SDTAKYSLKA
FNEQPFVAVK  EQVINGQWY  YGKLSNGKLA  WIKSTD LAKE  LIKYNQTGMT
LNQVAQIQAG  LQYKPQVQRV  PGKWT DANFN  DVKHAMDTKR  LAQDPALKYQ
FLRLDQPQNI  SIDKINQFLK  GKGVLENQGA  AFNKAQMYG  INEVYLISHA
LLETGNGTSQ  LAKGADVNN  KVVTSNTKY  HNVFGIAAYD  NDPLREGIKY
AKQAGWDTVS  KAIVGGAKFI  GNSYVKAGQN  TLYKMRWNPA  HPGTHQYATD
VDWANINAKI  IKGYYDKIGE  VGKYFDIPQY

```

En la SEQ ID NO: 36, los residuos subrayados corresponden a los residuos 783 a 931 de la autolisina codificada, y representan el dominio R3. Los residuos C-terminales restantes (no subrayados) corresponden al dominio de la glucosaminidasa catalítica.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal de la presente invención se une a un epítipo conservado de glucosaminidasa de *Staphylococcus aureus* con una afinidad superior a 10^{-9} M. Como se usa en el presente documento, "epítipo" se refiere al determinante antigénico de glucosaminidasa de *Staphylococcus aureus* que se reconoce por el anticuerpo monoclonal. El epítipo reconocido por el anticuerpo de la presente invención puede ser un epítipo lineal, es decir, la estructura primaria de la secuencia de aminoácidos de la glucosaminidasa. Como alternativa, el epítipo reconocido por el anticuerpo de la presente invención puede ser un epítipo no lineal o conformacional, es decir, la estructura terciaria de la glucosaminidasa.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención se unen específicamente al dominio R3. En otras divulgaciones, los anticuerpos monoclonales pueden unirse específicamente al dominio catalítico del Gmd.

Los epítopos que están unidos por cinco de los anticuerpos monoclonales identificados en el presente documento están enteramente o al menos parcialmente dentro del dominio R3. A modo de ejemplo, un epítipo unido por mAb 3A8 se encuentra dentro de la región que contiene los residuos 776-842; un epítipo unido por mAb 1C11 se encuentra dentro de la región que contiene los residuos 842-873; un epítipo o epítopos unidos por los mAbs 2D11 y 1E12 son iguales o diferentes y se encuentran dentro de la región que contiene los residuos 842-948; y un epítipo unido por mAb 3H6 se encuentra dentro de la región que contiene los residuos 907-948.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal de la presente invención posee la actividad inhibidora de Gmd de *S. aureus*, por lo que el anticuerpo monoclonal inhibe la actividad de Gmd en al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 % o al menos el 50 %. En otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal inhibe la actividad de Gmd en al menos el 60 %, al menos el 70 %, o al menos el 80 %. Cinco anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento (mAbs 3A8, 1C11, 2D11, 1E12 y 3H6) poseen actividad inhibidora de anti-Gmd de aproximadamente el 70 a aproximadamente el 80 por ciento. Es un resultado sorprendente e inesperado que los anticuerpos de la presente invención se unirán a un supuesto dominio de unión a la pared celular, el dominio R3, en lugar de un dominio catalítico para inhibir la actividad enzimática. Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que la unión de los anticuerpos de la presente invención al dominio R3 puede desencadenar un cambio conformacional o electrostático en el dominio catalítico de la glucosaminidasa.

La inhibición de la actividad de Gmd se puede medir *in vitro*. De acuerdo con un enfoque, Gmd se pretitula en primer

5 lugar para determinar la concentración que producirá una reducción de aproximadamente un 50% en A_{490} en 60 minutos. Después, se añaden 50 μ l de anticuerpo diluido en PBST a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos seguido de 50 μ l de Gmd diluida apropiadamente, y la mezcla se deja incubar durante 5 o más minutos, y finalmente se añadieron 100 μ l de 0,15 % ml y se mide el A_{490} inicial. La placa se incuba a 37 °C y el A_{490} se mide en 30 y 60 minutos. El porcentaje de inhibición se calcula como $100 \cdot (1 - (\text{inhibidor } \Delta_{60}A_{490}/\text{control sin inhibidor } \Delta_{60}A_{490}))$.

10 En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal de la presente invención posee una capacidad para provocar la agrupación o agrupamiento de *S. aureus*, lisis independiente de las células de *S. aureus*, o ambos. Los ejemplos de anticuerpos que poseen una capacidad para producir aglomeración de *S. aureus* incluyen anticuerpos monoclonales 1C11, 1E12, 2D11, 3A8 y 3H6. Un ejemplo de un anticuerpo lítico es el anticuerpo monoclonal 1C11. Este anticuerpo se une a un epítipo único presente en el dominio R3, muestra entre aproximadamente el 70 a aproximadamente el 80 por ciento de actividad inhibidora de Gmd, y promueve la lisis independiente de las células de *S. aureus*.

15 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención también inhiben el crecimiento *in vivo* de *S. aureus*. La inhibición del crecimiento *in vivo* de *S. aureus* se puede medir de acuerdo con una serie de estándares adecuados. En una de tales realizaciones, el crecimiento *in vivo* de *S. aureus* puede evaluarse de acuerdo con un ensayo de bioluminiscencia del tipo descrito en los Ejemplos adjuntos. Específicamente, el *S. aureus* bioluminiscente (Xen 29; ATCC 12600) (Francis et al., "Monitoring Bioluminescent Staphylococcus aureus Infections in Living Mice Using a Novel luxABCDE Construct", Infect. Immun. 68(6):3594-600 (2000); véase también Contag et al., "Photonic Detection of Bacterial Pathogens in Living Hosts", Mol. Microbiol. 18(4):593-603 (1995)) se usa para dosificar un implante transbital con 500.000 UFC antes del implante quirúrgico. Los ratones hembra BALB/cJ de cinco semanas de edad pueden recibir una inyección intraperitoneal de solución salina (n = 10) o 1 mg de anticuerpo purificado en 0,25 ml de solución salina 3 días antes de la cirugía. Los ratones se pueden diagnosticar por imágenes para evaluar la bioluminiscencia en diversos días (por ejemplo, 0, 3, 5, 7, 11 y 14) y se puede comparar una comparación de imágenes BLI para evaluar si el anticuerpo inhibe el crecimiento *in vivo* de *S. aureus* en relación con el control de solución salina.

30 En una realización, el anticuerpo monoclonal de la presente invención comprende un dominio V_H que comprende una de las siguientes secuencias aminoacídicas:

35 EVQLQESGPVLPKPGASVKMSCKASGYTFTDYMNWVKQSHGKSLE
WIGVINPYNGDITYSQQFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVY
YCARNYDEYFDVWGTGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVT LGCXVKG (SEQ ID NO: 1) donde X es cualquier aminoácido; o

40 EVQLQESGPVLPKPGASVKLSCKASGYTFTDYFMNWKQSHGKSLE
WIGVINPFNGNRYNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAV
YYCARGDYDSPWFDYWGQGLTVTSAKTTTPPSVYPLAPGSAAQTNS MVTGLGLVKGYSXSQ (SEQ ID NO: 2), donde X es cualquier aminoácido; o

45 EVQLQESGGGFVLPKPGSLKLSAASGFTFSTYVMSWVRQTPEKRLEW
VATISDGGGHTYYLDNVKGRFTISRDNKNNLYLHMSHLKSEDAMY
YCARAYGSSYDAMDYWGQTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQT NSMVTGLGLVKG (SEQ ID NO: 3); o

EVQLQESGGGLVQPGGSMKLSAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLE
WVAEIKDKTNNHATYYAESVKGRFTISRDSKSRVFLQMNSLRPEDT
GIYYCTSGPYFDYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVT LGCLVKGYPPE (SEQ ID NO: 4); o

50 QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTYGMSWVNQAPGKGLKW
MGWINTYSGVPTYADDFKGRFVFSLETSASTAYLQINNLIKNETATYF
CAREEYSSGYAAWFPYWGQGLTVTSA (SEQ ID NO: 5); o

55 XXQLXXSGXXXXXPGXXXKXSCXASGXTFXXXXMXWVXQXXXKXL
XWXXXIXXXXXXXXXXXKXXXXXXXXXXXXXXXXXXLX
XEDXXXXCXXXXXWGXGTXXTVXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX, XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX,
donde X es cualquier aminoácido o delección del mismo (secuencia de consenso SEQ ID NO: 6; véase la figura 13); o

60 EVQLQESGXXXVPGXSXKXSCXASGXTFXXXXMXWVXQXXXKXL
EWXXXIXXXXXXXXXXXKXXTXXXDXXXXXXXXXXLX
XEDXXXXCXXXXXDXWGXGTXXTVSAKTTTPPSVYPL APGSAAQTNSMVTLGCXVKGXXXXX,
donde X es cualquier aminoácido o delección del mismo (secuencia de consenso SEQ ID NO: 31; véase la figura 11), o

65 XXQLXXSGXXLXXPGXXXKXSCXASGXTFXXXXMXWVXQXPXKGL

Se puede humanizar un anticuerpo sustituyendo la región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo humano con la de un anticuerpo no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc.) que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas (Jones et al., "Replacing the Complementarity-Determining Regions in a Human Antibody With Those From a Mouse", *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., "Reshaping Human Antibodies for Therapy", *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., "Reshaping Human Antibodies: Grafting an Antilysozyme Activity", *Science* 239: 1534-1536 (1988)). El anticuerpo humanizado puede modificarse adicionalmente mediante la sustitución de residuos adicionales en la región de marco Fv y/o dentro de los residuos no humanos sustituidos para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Pueden generarse linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o aislados de un individuo inmunizado que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (véase, por ejemplo, Reisfeld et al., *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY* 77 (Alan R. Liss ed., 1985) y la Patente de Estados Unidos n.º 5.750.373 de Garrard). Además, el anticuerpo humanizado puede seleccionarse de una biblioteca de fagos, donde dicha biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan et al., "Human Antibodies with Sub-Nanomolar Affinities Isolated from a Large Non-immunized Phage Display Library", *Nature Biotechnology*, 14: 309-314 (1996); Sheets et al., "Efficient Construction of a Large Nonimmune Phage Antibody Library: The Production of High-Affinity Human Single-Chain Antibodies to Protein Antigens", *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 6157-6162 (1998); Hoogenboom et al., "By-passing Immunisation. Human Antibodies From Synthetic Repertoires of Germline VH Gene Segments Rearranged *in vitro*", *J. Mol. Biol.* 227:381-8 (1992); Marks et al., "By-passing Immunization. Human Antibodies from V-gene Libraries Displayed on Phage", *J. Mol. Biol.* 222: 581-97 (1991)). Los anticuerpos humanizados también pueden hacerse en ratones transgénicos que contienen loci de inmunoglobulina humana que son capaces tras la inmunización de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Este enfoque se describe en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.545.807 de Surani et al.; 5.545.806 de Lonberg et al.; 5.569.825 de Lonberg et al.; 5.625.126 de Lonberg et al.; 5.633.425 de Lonberg et al.; y 5.661.016 de Lonberg et al.

Basándose en una búsqueda BLAST de Genbank usando las secuencias aminoácidas del dominio V_H y V_L 1C11, las secuencias homólogas en el genoma humano se identifican como IGVH7-81 e IGVK6D-21, respectivamente. Los alineamientos de estos dominios homólogos V_H y V_L (SEQ ID NOS: 19 y 20, respectivamente) con los dominios V_H y V_L 1C11 correspondientes se ilustran en las figuras 17A-B, respectivamente. Los dominios V_H y V_L comparten un grado de identidad sorprendentemente alto, respectivamente aproximadamente el 75 % y el 67 % sobre la región de homología (es decir, excluyendo la región CDR3H V_H). Estas secuencias IGVH7-81 e IGVK6D-21 pueden usarse para preparar un anticuerpo monoclonal sustancialmente puro de la presente invención. Dado que CDR3H no se codifica por el gen V_H, una región D adecuada necesitará cortarse y empalmarse en la región de dominio faltante. Puede usarse una cualquiera de varias regiones D candidatas (por ejemplo, IGHD5-5, 18 o 12*01).

Además de anticuerpos enteros, la presente invención incluye porciones de unión a antígeno de dichos anticuerpos. Tales porciones de unión al antígeno incluyen los fragmentos Fab monovalentes, fragmentos Fv (por ejemplo, anticuerpo monocatenario, scFv) y dominios V_H y V_L variables individuales, y los fragmentos F(ab')₂ bivalentes, Bis-scFv, diacuerpos, tricuerpos, minicuerpos, etc. Estos fragmentos de anticuerpo pueden fabricarse mediante procedimientos convencionales, tales como procedimientos de fragmentación proteolítica, como se describe en James Goding, *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE* 98-118 (Academic Press, 1983) y Ed Harlow y David Lane, *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL* (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988); Houston et al., "Protein Engineering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced in *Escherichia coli*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883 (1988); Bird et al., "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", *Science* 242: 423-426 (1988), u otros métodos conocidos en la técnica. Además, puede ser deseable, especialmente en el caso de fragmentos de anticuerpo, modificar el anticuerpo para aumentar su semivida en suero. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión al receptor de rescate en el fragmento de anticuerpo por mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o incorporando el sitio de unión del epítipo a una etiqueta de péptido que se fusiona después al fragmento de anticuerpo en un extremo o en el medio (por ejemplo, por ADN o síntesis peptídica).

Los imitadores de anticuerpos también son adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención. Se conocen varios imitadores de anticuerpos en la técnica incluyendo, sin limitación, los conocidos como monocuerpos, que se derivan del décimo dominio de fibronectina de tipo III humano (¹⁰Fn3) (Koide et al., "The Fibronectin Type III Domain as a Scaffold for Novel Binding Proteins", *J. Mol. Biol.* 284: 1141-1151 (1998); Koide et al., "Probing Protein Conformational Changes in Living Cells by Using Designer Binding Proteins: Application to the Estrogen Receptor", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1253-1258 (2002); y aquellos conocidos como aficuerpos, que se derivan del dominio estable del receptor bacteriano alfa-helicoidal Z de la proteína A estafilocócica (Nord et al., "Binding Proteins Selected from Combinatorial Libraries of an alpha-helical Bacterial Receptor Domain", *Nature Biotechnol.* 15(8): 772-777 (1997)).

En la preparación de estos imitadores de anticuerpos, las secuencias CDR de las cadenas V_H y/o V_L pueden injertarse en las regiones de bucle variables de estos imitadores de anticuerpos (véanse las figuras 11 y 17 para dominios CDR putativos). El injerto puede implicar una delección de al menos dos residuos de aminoácidos hasta

sustancialmente todos menos un residuo de aminoácido que aparece en una región de bucle particular junto con la sustitución de la secuencia CDR. Las inserciones pueden ser, por ejemplo, una inserción del dominio CDR en una o más ubicaciones de una región de bucle particular. Los imitadores de anticuerpos de la presente invención poseen preferiblemente una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50 % homóloga a las secuencias de cadenas V_H y/o V_L desveladas en la presente solicitud. Las deleciones, inserciones y reemplazos en los polipéptidos pueden lograrse usando técnicas recombinantes que comienzan con una secuencia de nucleótidos conocida (véase a continuación).

Los métodos para la producción de anticuerpos monoclonales se pueden conseguir usando las técnicas descritas en el presente documento u otras conocidas en la técnica (MONOCLONAL ANTIBODIES - PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATIONS (Mary A. Ritter and Heather M. Ladyman eds., 1995)). Generalmente, el proceso implica la obtención de células inmunitarias (linfocitos) del bazo de un mamífero que ha sido previamente inmunizado con el antígeno de interés (es decir, glucosaminidasa de *S. aureus* o fragmentos peptídicos de los mismos).

Los linfocitos secretores de anticuerpos se fusionan entonces con células de mieloma o células transformadas, que son capaces de replicarse indefinidamente en cultivo celular, produciendo de este modo una línea celular inmortal, que segrega inmunoglobulina. La fusión con células de mieloma de mamífero u otros compañeros de fusión capaces de replicarse indefinidamente en cultivo celular se consigue mediante técnicas estándar y bien conocidas, por ejemplo, utilizando polietilenglicol (PEG) u otros agentes de fusión (Milstein y Kohler, "Derivation of Specific Antibody-Producing Tissue Culture and Tumor Lines by Cell Fusion", Eur. J. Immunol. 6: 511 (1976)). La línea celular inmortal, que es preferiblemente murina, pero también puede derivarse de células de otras especies de mamíferos, se selecciona para ser deficiente en enzimas necesariamente para la utilización de ciertos nutrientes, para ser capaz de crecer rápido, y tener buena capacidad de fusión. Las células fusionadas resultantes, o hibridomas, se cultivan, y las colonias resultantes se criban para la producción de los anticuerpos monoclonales deseados. Las colonias que producen tales anticuerpos se clonan y crecen *in vivo* o *in vitro* para producir grandes cantidades de anticuerpos.

Por lo tanto, un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una línea celular que expresa un anticuerpo monoclonal de la presente invención. En una realización, el anticuerpo monoclonal de la presente invención se produce por una línea celular de hibridoma designada como 1C11, 1E12, 2D11, 3A8 o 3H6. En otra realización, el anticuerpo monoclonal de la presente invención (o una porción de unión a antígeno del mismo) se produce por una célula o línea celular recombinante.

Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando métodos de ADN recombinante como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567 de Cabilly et al. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan a partir de células B maduras o células de hibridoma, por ejemplo, mediante RT-PCR utilizando cebadores de oligonucleótidos que amplifican específicamente los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesadas y ligeras se clonan a continuación en vectores de expresión adecuados, que cuando se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, generan células huésped que expresan y secretan anticuerpos monoclonales. Además, los anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de los mismos de las especies deseadas se pueden aislar a partir de bibliotecas de presentación de fagos (McCafferty et al., "Phage Antibodies: Filamentous Phage Displaying Antibody Variable Domains", Nature 348: 552-554 (1990); Clackson et al., "Making Antibody Fragments using Phage Display Libraries", Nature 352: 624-628 (1991); y Marks et al., "By-Passing Immunization. Human Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage", J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)).

La presente divulgación también incluye una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención. En una realización, el ácido nucleico es ADN. Los ejemplos de tales secuencias de ADN son aquellos que comprenden una secuencia que codifica V_H y/o V_L de la presente invención. La secuencia de ADN que codifica el hibridoma 2D11 V_H (correspondencia de línea germinal más cercana: J558.18.108) tiene la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 21) como se indica a continuación

```
GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGTGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCC
TGTAAAGCCTTCTGGATACACATTCACCTGACTACTATATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGA
AAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGTTATTAATCCTTACAACGGTGATACTACCTACAGCCAGAAG
TTCAAGGGCAAGGCCACATTTGACTGTTGACAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAAC
AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAAATTACGACGAGTACTTTCGAT
GTCTGGGGCACAGGGACCAGGTACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTAT
CCACTGGCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCNGGTCAAG
GGC
```

La secuencia de ADN que codifica el hibridoma 3H6 V_H (correspondencia de línea germinal más cercana: J558.18.108) tiene la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 23) como se indica a continuación:

ES 2 606 017 T3

```
GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGTGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCC
TGTAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTTATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGA
AAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGTTATTAATCCTTCAACGGTGGTAATAGGTACACCAGAAC
TTCAAGGGCAAGGCCACATTTGACTGTTGACAAGTCCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAAC
AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGGGACTATGACTCCCCCTGG
TTTGATTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCATCT
GTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTG
GTCAAGGGCTATTCCCNGAGCCAGTG
```

La secuencia de ADN que codifica el hibridoma 1E12 V_H (correspondencia de línea germinal más cercana: 7183.46 VH7) tiene la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 25) como se indica a continuación:

5

```
GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTCGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCACTACCTATGTCATGTCTGGGTTCGCCAGACTCCGGAA
AAGAGGCTGGAGTGGGTGCAACCATTAGTGATGGTGGTGGTCATACTTACTATCTAGACAAT
GTAAAGGGCCGATTCCCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTACCTGCACATGAGC
CATCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGCTTACTACGGTAGTAGTTAC
GACGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCC
CCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGA
TGCTGGTCAAGGGC
```

La secuencia de ADN que codifica el hibridoma 3A8 V_H (correspondencia de línea germinal más cercana: VHJ606.4.8.2) tiene la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 27) como se indica a continuación:

10

```
GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTCGTGCAACCTGGAGGATCCATGAAACTCTCT
TGTGCTGCCTCTGGATTCACTTTTAGTGACGCCTGGATGGACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAG
AAGGGCTTGAGTGGGTGCTGAAATTAAGACAAAATAATAATCATGCAACATACTATGCT
GAGTCTGTGAAAGGGAGGTTCAACCATCTCAAGAGATGTTTCCAAAAGTCGTGTCTTCTCGCAA
ATGAACAGCTTAAGACCTGAAGACACTGGCATTATTACTGTACGTCCTGGCCATATTTTGAC
TACTGGGGCCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTAT
CCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAG
GGCTATTTCCCTGAG
```

La secuencia de ADN que codifica el hibridoma 1C11 V_H (correspondencia de línea germinal más cercana: VH 9-15, DST4-C57B1-6, JH3) tiene la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 29) como se indica a continuación:

15

```
CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCC
TGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAACGTATGGAATGAGCTGGGTGAATCAGGCTCCAGGA
AAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTACTCTGGAGTGCCACATATGCTGATGAC
TTCAAGGGACGGTTTGTCTCTCTTTGAAACCTCTGCCAGCACTCCCTATTTGCAGATCAAC
AACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGAGAGGATACAGCTCAGGCTAC
GCGGCCTGGTTTCCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
```

La secuencia de ADN que codifica 2D11 V_L (correspondencia de línea germinal más cercana: at4) tiene la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 22) como se indica a continuación:

20

```
GATATTGTGATGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAACATG
ACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCC
CCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCACTGGC
AGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAATCAGCCGAATGGAGGCTGAGGATGCTGCCACT
TATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTTACCCGCTCACGTTCCGGT
```

La secuencia de ADN que codifica 3H6 V_L (correspondencia de línea germinal más cercana: cp9, JK1) tiene la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 24) como se indica a continuación:

25

```
CAGATGACACAGACTACGTCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGC
AGTGCAAGTCAGGGCATTAGCAATTAATTAAGTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGT
AAACTCCTGATCTATTACACATCAAGTTTACACTCAGGAGTCCATCAAGGTTCACTGGCGGT
GGGTCTGGGACAGATTATCTCTCTCCATCAGCAACCTGGAACTGAAGATATTGCCACTTAC
TATTGTCAGCAGTATAGTAAGCTTCCCTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAA
```

La secuencia de ADN que codifica 1E12 V_L (correspondencia de línea germinal más cercana: ai4) tiene la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 26) como se indica a continuación:

30

GATATTGTGATCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAACGGGTACCCATG
 ACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTCAGTACTTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGA
 TCCTCCCCAACTNTGGATTTATAGCACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTC
 AGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCT
 GCCACTTATTACTGCCACCAGTATCATCGTTCCCCATGGACGTTCCGGTGGAGGCACC

La secuencia de ADN que codifica 3A8 VL (correspondencia de línea germinal más cercana: KV 19-25, JK2) tiene la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 28) como se indica a continuación:

5

GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTACGCATC
 ACCTGCAAGGCCAGTCAGGACGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAAAAACAGGGCAA
 TCCTCTAAACTACTGATTACTGGACATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACA
 GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTAAAGACCTGGCA
 CTTTATTACTGTCAGCAACATTATACCACTCCGTACACGTTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGAA
 ATAAAA

La secuencia de ADN que codifica 1C11 VL (correspondencia de línea germinal más cercana: VK23-43, JK5) tiene la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 30) como se indica a continuación:

10

GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAGTCTT
 TCCTGCAGGGCCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAACAAAAATCACATGAG
 TCTCCAAGGCTTCTCATCGAATATGCTTCCCGGTCCATCTCTGGGATCCCCTCTAGGTTTCTAGT
 GGCGGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATTTTGG
 TTGTATTTCTGTCAACAGAGTAACAGCTGGCCGCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAG
 CTGAAA

Aún un aspecto adicional de la presente divulgación es una construcción de ADN que comprende una molécula de ADN que codifica un anticuerpo o porción de unión a antígeno de la presente invención, una molécula de ADN eficaz para el promotor acoplada al extremo 5' de la molécula de ADN, y una molécula de ADN de terminación de transcripción acoplada operativamente 3' de la molécula de ADN. La presente divulgación también incluye un vector de expresión en el que se inserta la construcción de ADN de la presente invención. Un gen sintético para los polipéptidos de la presente invención puede diseñarse de manera que incluya sitios de restricción convenientes para facilitar la mutagénesis y use codones específicos para la expresión de proteínas de alto nivel (Gribskov et al., "The Codon Preference Plot: Graphic Analysis of Protein Coding Sequences and Prediction of Gene Expression", Nuc. Acids. Res. 12: 539-549 (1984)).

15

20

El gen se puede ensamblar como se indica a continuación: en primer lugar, la secuencia génica se puede dividir en partes con límites en los sitios de restricción diseñados; para cada parte, se puede sintetizar un par de oligonucleótidos que codifican hebras opuestas y tienen superposiciones complementarias de aproximadamente 15 bases; los dos oligonucleótidos pueden hibridarse y las regiones monocatenarias pueden rellenarse utilizando el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa; el oligonucleótido bicatenario puede clonarse en un vector, tal como, el vector pET3a (Novagen) usando sitios de enzimas de restricción en los extremos del fragmento y su secuencia puede confirmarse mediante un secuenciador de ADN; y estas etapas pueden repetirse para cada una de las partes para obtener el gen completo. Este enfoque tarda más tiempo para ensamblar un gen que el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) de una etapa (Sandhu et al., "Dual Asymmetric PCR: One-Step Construction of Synthetic Genes", BioTech. 12: 14-16 (1992)). Las mutaciones probablemente pueden introducirse por la replicación de baja fidelidad por la polimerasa Taq y requerirán una edición génica prolongada. Las manipulaciones de ADN recombinante pueden realizarse de acuerdo con SAMBROOK & RUSSELL, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ª ed. 1989), a menos que se indique otra cosa. Para evitar la introducción de mutaciones durante una PCR de una etapa, se pueden emplear polimerasas de alta fidelidad/error bajo como se conoce en la técnica.

25

30

35

Las mutaciones deseadas pueden introducirse en la secuencia polipeptídica de la presente invención usando mutagénesis de casete, técnicas de mutagénesis dirigida a oligonucleótidos (Deng & Nickoloff, "Site-Directed Mutagenesis of Virtually any Plasmid by Eliminating a Unique Site", Anal. Biochem. 200: 81-88 (1992)), o mutagénesis de Kunkel (Kunkel et al., "Rapid and Efficient Site-Specific Mutagenesis Without Phenotypic Selection", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492 (1985); Kunkel et al., "Rapid and Efficient Site-Specific Mutagenesis Without Phenotypic Selection", Methods Enzymol. 154: 367-382 (1987)).

40

45

Tanto la mutagénesis de casete como la mutagénesis dirigida a sitio pueden usarse para preparar secuencias codificantes de nucleótidos específicamente deseadas. La mutagénesis de casete puede realizarse usando el mismo protocolo para la construcción génica descrita anteriormente y el fragmento de ADN bicatenario que codifica una nueva secuencia puede clonarse en un vector de expresión adecuado. Muchas mutaciones pueden hacerse combinando una cadena recién sintetizada (mutaciones de codificación) y un oligonucleótido utilizado para la síntesis génica. Independientemente del enfoque utilizado para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la presente invención, se puede realizar la secuenciación para confirmar que las mutaciones diseñadas (y ninguna otra mutación) se introdujeron por reacciones de mutagénesis.

50

Por el contrario, la mutagénesis de Kunkel puede utilizarse para producir aleatoriamente una pluralidad de secuencias codificantes de polipéptidos mutados que pueden usarse para preparar una biblioteca combinatoria de polipéptidos para el cribado. Básicamente, las regiones de bucle diana (o las regiones de cola C-terminal o N-terminal) se pueden asignar al azar usando el codón NNK (representando N una mezcla de A, T, G, C, y representando K una mezcla de G y T) (Kunkel et al., "Rapid and Efficient Site-Specific Mutagenesis Without Phenotypic Selection", *Methods Enzymol.* 154: 367-382 (1987)).

Independientemente del enfoque usado para preparar las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico puede incorporarse en células huésped usando tecnología convencional de ADN recombinante. Generalmente, esto implica la inserción de la molécula de ADN en un sistema de expresión al que la molécula de ADN es heteróloga (es decir, normalmente no presente). La molécula de ADN heteróloga se inserta en el sistema de expresión o vector en orientación de sentido y marco de lectura correcto. El vector contiene los elementos necesarios (promotores, supresores, operadores, secuencias de terminación de transcripción, etc.) para la transcripción y la traducción de las secuencias codificantes de proteínas insertadas. Se puede preparar un gen recombinante o construcción de ADN antes de su inserción en un vector de expresión. Por ejemplo, usando técnicas convencionales de ADN recombinante, se puede acoplar de forma operativa una molécula de ADN eficaz para promotor 5' de una molécula de ADN que codifica el polipéptido y una terminación de transcripción (es decir, secuencia de poliadenilación) puede acoplarse operativamente 3' de la misma.

De acuerdo con este aspecto de la divulgación, los polinucleótidos de la presente divulgación se insertan en un sistema o vector de expresión al que la molécula es heteróloga. La molécula de ácido nucleico heteróloga se inserta en el sistema o vector de expresión en la orientación de sentido apropiada (5' → 3') con relación al promotor y cualquier otra molécula reguladora 5', y el marco de lectura correcto. La preparación de las construcciones de ácido nucleico puede realizarse usando métodos de clonación estándar bien conocidos en la técnica como se describe por SAMBROOK & RUSSELL, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL* (Cold Springs Laboratory Press, 2001). La Patentes de Estados Unidos n.º 4.237.224 de Cohen y Boyer también describe la producción de sistemas de expresión en forma de plásmidos recombinantes usando escisión de enzimas de restricción y ligadura con ADN ligasa.

Los vectores de expresión adecuados incluyen aquellos que contienen secuencias de replicón y de control que se derivan de especies compatibles con la célula huésped. Por ejemplo, si *E. coli* se usa como célula huésped, pueden usarse plásmidos tales como pUC19, pUC18 o pBR322. Al usar células huésped de insecto, los vectores de transferencia apropiados compatibles con células huésped de insecto incluyen, pVL1392, pVL1393, pAcGP67 y pAcSecG2T, que incorporan una señal secretora fusionada a la proteína deseada, y pAcGHLT y pAcHLT, que contienen etiquetas GST y 6xHis (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Los vectores víricos adecuados para su uso en la realización de este aspecto de la invención incluyen, vectores adenovirales, vectores víricos adeno-asociados, vectores víricos de vacuna, vectores nodavíricos y vectores retrovíricos. Otros vectores de expresión adecuados se describen en SAMBROOK AND RUSSELL, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL* (Cold Springs Laboratory Press, 2001). Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (Fred M. Ausubel et al. eds., 2003).

Las diferentes señales genéticas y los eventos de procesamiento controlan muchos niveles de expresión génica (por ejemplo, transcripción de ADN y traducción de ARN mensajero ("ARNm")) y posteriormente la cantidad de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se producen y se expresan por la célula huésped. La transcripción del ADN depende de la presencia de un promotor, que es una secuencia de ADN que dirige la unión de la ARN polimerasa, y por lo tanto promueve la síntesis de ARNm. Los promotores varían en su "resistencia" (es decir, su capacidad para promover la transcripción). Con el fin de expresar un gen clonado, es deseable utilizar promotores fuertes para obtener un alto nivel de transcripción y, por lo tanto, la expresión. Dependiendo del sistema huésped utilizado, puede usarse uno cualquiera de un número de promotores adecuados. Por ejemplo, al usar *E. coli*, sus bacteriófagos, o plásmidos, los promotores, tales como el promotor de fagos T7, el promotor *lac*, el promotor *trp*, el *recA*promotor, el promotor de ARN ribosomal, los promotores P_R y P_L de colifago lambda y otros, incluyendo, pero sin limitación, para *lacUV5*, *ompF*, *bla*, *lpp*, y similares, se pueden usar para dirigir altos niveles de transcripción de segmentos de ADN adyacentes. Adicionalmente, se puede usar un promotor híbrido *trp-lacUV5* (*tac*) u otros promotores de *E. coli* producidos por ADN recombinante u otras técnicas de ADN sintético para proporcionar la transcripción del gen insertado. Cuando se usan células de insecto, los promotores de baculovirus adecuados incluyen promotores tardíos, tales como promotor de proteína 39K o promotor de proteína básica, y promotores muy tardíos, tales como los promotores p10 y poliedro. En algunos casos, puede ser deseable utilizar vectores de transferencia que contienen múltiples promotores de baculovirus. Los promotores comunes adecuados para dirigir la expresión en células de mamíferos incluyen, sin limitación, SV40, MMTV, metalotioneína-1, adenovirus Ela, CMV, promotor y potenciador de cadena pesada de inmunoglobulina, inmediata temprana, y RSV-LTR. Los promotores pueden ser constitutivos o, como alternativa, específicos de tejido o inducibles. Además, pueden usarse en algunas circunstancias promotores inducibles (TetOn).

La traducción de ARNm en procariotas depende de la presencia de las señales procariotas propias, que difieren de las de eucariotas. La traducción eficiente de ARNm en procariotas requiere un sitio de unión al ribosoma denominado la secuencia Shine-Dalgarno ("SD") en el ARNm. Esta secuencia es una secuencia nucleotídica corta de ARNm que está situada antes del codón de inicio, normalmente AUG, que codifica la metionina amino-terminal de la proteína. Las secuencias SD son complementarias al extremo 3' del ARNr 16S (ARN ribosómico) y promueven la unión de ARNm a ribosomas por duplexación con el ARNr para permitir el posicionamiento correcto del ribosoma. Para una revisión sobre la maximización de la expresión génica, véase Roberts y Lauer, "Maximizing Gene Expression on a Plasmid Using Recombination In Vitro", *Methods in Enzymology*, 68: 473-82 (1979).

La presente invención también incluye una célula huésped transformada con la construcción de ADN de la presente divulgación. La célula huésped puede ser un procariota o un eucariota. Las células huésped adecuadas para expresar los polipéptidos de la presente invención incluyen una cualquiera de las bacterias gram negativas más comúnmente disponibles. Los microorganismos adecuados incluyen *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella gastroenteritis* (*typhimurium*), *S. typhi*, *S. enteritidis*, *Shigella flexneri*, *S. sonnie*, *S. dysenteriae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *H. pleuropneumoniae*, *Pasteurella haemolytica*, *P. multilocida*, *Legionella pneumophila*, *Treponema pallidum*, *T. denticola*, *T. orales*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia spp.*, *Leptospira interrogans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *P. morgani*, *P. mirabilis*, *Rickettsiaprowazeki*, *R. typhi*, *R. rickettsii*, *Porphyromonas (Bacteriodes) gingivalis*, *Chlamydia psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *Campylobacter jejuni*, *C. intermedis*, *C. fetus*, *Helicobacter pylori*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderie pseudomallei*, *Brucella abortus*, *B. susi*, *B. melitensis*, *B. canis*, *Spirillum minus*, *Pseudomonas mallei*, *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, y *Yersinia pestis*.

Además de las células bacterianas, las células animales, en particular las células de mamíferos y de insectos, las células de levadura, células de hongos, células de plantas o las células de algas son también células huésped adecuadas para la transfección/transformación del vector de expresión recombinante que lleva una molécula de polinucleótido aislada de la presente invención. Las líneas celulares de mamífero usadas habitualmente en la técnica incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células COS y muchas otras. Las líneas celulares de insectos adecuadas incluyen aquellas susceptibles a infección baculoviral, incluyendo células *Sf9* y *Sf21*.

Los métodos para transformar/transfectar células huésped con vectores de expresión se conocen bien en la técnica y dependen del sistema huésped seleccionado, tal como se describe en SAMBROOK & RUSSELL, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Springs Laboratory Press, 2001). Para las células bacterianas, las técnicas adecuadas incluyen la transformación de cloruro cálcico, la electroporación y la transfección usando bacteriófago. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas incluyen transfección con fosfato cálcico, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus o cualquier otro vector vírico. Para las células de insecto, el vector de transferencia que contiene la construcción de polinucleótido de la presente invención se cotransfecta con ADN de baculovirus, tal como AcNPV, para facilitar la producción de un virus recombinante. La infección vírica recombinante posterior de las células *Sf* da como resultado una alta tasa de producción de proteína recombinante. Independientemente del sistema de expresión y de la célula huésped utilizados para facilitar la producción de proteínas, los anticuerpos expresados, fragmentos de anticuerpos o imitadores de anticuerpos de la presente invención pueden purificarse fácilmente usando métodos de purificación convencionales conocidos en la técnica y descritos en PHILIP L.R. BONNER, PROTEIN PURIFICATION (Routledge 2007).

El polinucleótido o polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal puede modificarse adicionalmente usando tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. Por ejemplo, los dominios constantes de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden sustituirse por aquellas regiones de un anticuerpo humano para generar un anticuerpo humanizado (o quimérico), como se ha discutido anteriormente. Como alternativa, los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden sustituirse por un polipéptido no inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En otras realizaciones, las regiones constantes se truncan o se eliminan para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. Además, la mutagénesis dirigida a sitio o de alta densidad de la región variable puede usarse para optimizar la especificidad y la afinidad de un anticuerpo monoclonal.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un vehículo y uno o más anticuerpos monoclonales o una o más porciones de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención. Esta composición farmacéutica puede contener dos o más anticuerpos o fragmentos de unión donde todos los anticuerpos o fragmentos de unión reconocen el mismo epítipo. Como alternativa, la composición farmacéutica puede contener un anticuerpo o mezcla de fragmentos de unión donde uno o más anticuerpos o fragmentos de unión reconocen un epítipo de Gmd de *S. aureus* y uno o más anticuerpos o fragmentos de unión reconocen un epítipo diferente de Gmd *S. aureus*. Por ejemplo, la mezcla puede contener uno o más anticuerpos de la presente invención que se unen específicamente a un dominio R3 de glucosaminidasa de *Staphylococcus aureus* en combinación con cualquier otro anticuerpo que se une a glucosaminidasa, tal como un anticuerpo que se une al dominio catalítico de la glucosaminidasa. La composición farmacéutica de la presente invención contiene además un vehículo farmacéuticamente aceptable u otros componentes farmacéuticamente aceptables como se describe más

adelante.

De acuerdo con una realización, la composición farmacéutica incluye uno o más de los mAb 1C11, 2D11, 3H6, 1E12 y 3A8 en un vehículo farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con otra realización, la composición farmacéutica incluye dos o más de los mAb 1C11, 2D11, 3H6, 1E12 y 3A8 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una composición farmacéutica que contiene los anticuerpos monoclonales de la presente invención se puede administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una infección por *Staphylococcus*. Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar los anticuerpos de la presente invención. Los métodos de introducción incluyen, pero sin limitación, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. El agente terapéutico se puede administrar, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, y similares) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos, tales como agentes quimioterapéuticos, agentes antibióticos u otros agentes inmunoterapéuticos. La administración puede ser sistémica o local, es decir, en un sitio de infección por Staph o directamente a un sitio quirúrgico o de implante.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además la administración de un segundo agente terapéutico al paciente, en la que el segundo agente terapéutico es un agente antibiótico o un agente inmunoterapéutico. Los ejemplos de agentes antibióticos incluyen, sin limitación, vancomicina, tobramicina, cefazolina, eritromicina, clindamicina, rifampina, gentamicina, ácido fusídico, minociclina, co-trimoxazol, clindamicina, linezolid, quinupristina-dalfopristina, daptomicina, tigeciclina, dalbavancina, telavancina, oritavancina, ceftobiprol, ceftarolina, iclaprim, el carbapenem CS-023/RO-4908463, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de agentes inmunoterapéuticos incluyen, sin limitación tefibazumab, BSYX-A110, Aurexis™, y combinaciones de los mismos. Las listas anteriores de agentes antibióticos y agentes inmunoterapéuticos pretenden ser ejemplos no limitantes; por lo tanto, también se contemplan otros agentes antibióticos o agentes inmunoterapéuticos. Las combinaciones o mezclas del segundo agente terapéutico también pueden usarse para los fines de la presente invención. Estos agentes se pueden administrar simultáneamente o como una única formulación.

La composición farmacéutica incluye normalmente uno o más vehículos farmacéuticos (por ejemplo, líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares). El agua es un vehículo más típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada seca, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes de pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales, tales como triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir vehículos estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del ácido nucleico o proteína, normalmente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. Las formulaciones corresponden al modo de administración.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las infecciones bacterianas que se han descrito anteriormente varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo el modo de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o se termina, y preferiblemente hasta que el paciente muestra una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico. Para el tratamiento profiláctico contra la infección bacteriana por *Staphylococcus*, se pretende que la composición o composiciones farmacéuticas de la presente invención se puedan administrar antes de la exposición de un individuo a la bacteria y que la respuesta inmune resultante pueda inhibir o reducir la gravedad de la infección bacteriana de tal forma que las bacterias pueden ser eliminadas del individuo. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal o la composición farmacéutica puede administrarse antes, durante y/o inmediatamente después de un procedimiento quirúrgico, tal como la sustitución de una articulación o cualquier cirugía que implique un implante protésico.

Para la inmunización pasiva con un anticuerpo o fragmento de unión de la presente invención, los intervalos de dosificación varían de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg, y más normalmente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones

5 pueden ser de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, o dentro del intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg. Un régimen de tratamiento a modo de ejemplo implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran
 10 simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado está dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo se administra normalmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser diarios, semanales, mensuales o anuales. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpo plasmático de 1-1000 µg/ml y en algunos métodos 25-300 µg/ml. Como alternativa, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una
 15 administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguida de anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos.

15 Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a una vacuna activa (por ejemplo, composición farmacéutica) que incluye un vehículo y una molécula antigénica que comprende al menos un fragmento de la glucosaminidasa de *S. aureus*. La molécula antigénica puede estar en forma de (i) una proteína de fusión que incluye el polipéptido de glucosaminidasa y un polipéptido adyuvante o (ii) un conjugado inmunogénico que incluye el polipéptido de glucosaminidasa conjugado con otra molécula inmunogénica.

20 A modo de ejemplo, las proteínas de fusión adecuadas de la presente divulgación incluyen aquellas que contienen un polipéptido adyuvante seleccionado del grupo de la flagelina, las proteínas L1 o L2 del virus del papiloma humano (HPV), la glicoproteína D del herpes simplex (gD), la proteína de unión del complemento C4, un ligando del receptor 4 tipo toll (TLR4), e IL-1β.

25 El polipéptido o proteína de fusión de la presente divulgación se puede generar usando técnicas estándar conocidas en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido de fusión puede prepararse mediante la traducción de una fusión en el marco de las secuencias de polinucleótidos de la presente divulgación y el adyuvante, es decir, un gen híbrido o quimérico. El gen híbrido que codifica el polipéptido de fusión se inserta en un vector de expresión que se usa para transformar o transfectar una célula huésped. Como alternativa, la secuencia polinucleotídica que codifica el
 30 polipéptido de la presente divulgación se inserta en un vector de expresión en el que ya está presente el polinucleótido que codifica el adyuvante. El adyuvante peptídico de la proteína de fusión puede fusionarse con el extremo N, o preferiblemente, con el extremo C-terminal del polipéptido de glucosaminidasa de la presente divulgación.

35 Las fusiones entre los polipéptidos de la presente divulgación y el adyuvante de proteína pueden ser tales que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la presente divulgación sea directamente contigua con la secuencia de aminoácidos del adyuvante. Como alternativa, la porción de polipéptido se puede acoplar al adyuvante por medio de una secuencia enlazadora corta. Las secuencias de enlazador adecuadas incluyen enlazadores ricos en glicina (por ejemplo, GGGS₂₋₃), enlazadores ricos en serina (por ejemplo, GS_N), u otros enlazadores de inmunoglobulina flexible
 40 como se desvela en la Patente de Estados Unidos n.º 5.516.637 de Huang et al.

Los conjugados inmunogénicos adecuados de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, aquellos que contienen una molécula portadora inmunogénica unida de forma covalente o no covalente a cualquier polipéptido de glucosaminidasa. Puede usarse cualquier molécula portadora inmunogénica adecuada. Las moléculas portadoras
 45 inmunogénicas incluyen albúmina de suero bovino, ovoalbúmina de huevo de pollo, hemocianina de lapa californiana, toxoide tetánico, toxoide diftérico, tiroglobulina, un polisacárido capsular neumocócico, CRM 197 y una proteína de membrana externa meningocócica.

La composición farmacéutica en forma de una vacuna activa también puede incluir una cantidad eficaz de un adyuvante separado. Los adyuvantes adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio y potasio, sulfato de berilio, sílice, caolín, carbono, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, dipéptido de muramilo, endotoxina bacteriana, lípido, Quil A, y/o *Bordetella pertussis* no infecciosa.
 50

55 La elección de un adyuvante depende de la estabilidad de la formulación inmunogénica que contiene el adyuvante, la vía de administración, el programa de dosificación, la eficacia del adyuvante para la especie que se vacuna y, en seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que se ha aprobado o puede aprobarse para su administración en seres humanos por los órganos reguladores pertinentes. Por ejemplo, el alumbre, MPL o adyuvante de Freund incompleto (Chang et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 32: 173-186 (1998)) en solitario u
 60 opcionalmente todas las combinaciones de los mismos son adecuados para su administración en seres humanos.

65 En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas que contienen los polipéptidos de glucosaminidasa inmunogénica se administran a un paciente susceptible a, o en riesgo de otro modo, de la infección bacteriana en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar el inicio de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios presentados durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas,

las composiciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la presente invención se administran a un paciente sospechoso de, o que ya sufre, tal enfermedad en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad (bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. Una cantidad adecuada para realizar un tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéuticamente o profilácticamente eficaz, que se ha identificado anteriormente. Tanto en los regímenes profilácticos como terapéuticos, los agentes se administran normalmente en varias dosis hasta que se ha conseguido una respuesta suficiente. Normalmente, se controla la respuesta y se dan dosificaciones repetidas si la respuesta comienza a disminuir.

Las dosis de tratamiento deben ser tituladas para optimizar la seguridad y la eficacia. La cantidad de inmunógeno depende de si también se administra adyuvante, siendo necesarias dosificaciones más altas en ausencia de adyuvante. La cantidad de un inmunógeno para la administración varía a veces de 1-500 µg por paciente y más normalmente de 5-500 µg por inyección para administración en seres humanos. Ocasionalmente, se usa una dosis más alta de 1-2 mg por inyección. Normalmente se utiliza aproximadamente 10, 20, 50 o 100 µg para cada inyección humana. La masa de inmunógeno también depende de la relación de masa del epítipo inmunógeno dentro del inmunógeno con respecto a la masa del inmunógeno en su conjunto. Normalmente, se usan de 10^{-3} a 10^{-5} micromoles de epítipo inmunogénico para cada microgramo de inmunógeno. El momento de las inyecciones puede variar significativamente de una vez al día, a una vez al año, a una vez una década. En cualquier día dado que se administre una dosis de inmunógeno, la dosificación es mayor de 1 µg/paciente y normalmente mayor de 10 µg/paciente si se administra también adyuvante, y mayor de 10 µg/paciente y normalmente mayor de 100 µg/paciente en ausencia de adyuvante. Un régimen típico consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo a intervalos de tiempo, tales como intervalos de 6 semanas. Otro régimen consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses después. Como alternativa, las inyecciones de refuerzo pueden proporcionarse sobre una base regular o irregular, como se indica por la monitorización de la respuesta inmune.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, o una composición farmacéutica de la presente invención para su uso en un método de tratamiento de una infección por *S. aureus* en un paciente que tiene una infección por *S. aureus*.

En una realización de este aspecto de la invención, el uso comprende repetir la administración al paciente de un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo o una composición farmacéutica de la presente invención. El uso puede ser tal que la administración se realice sistemáticamente o se realice directamente a un sitio de la infección por *S. aureus*

El uso puede ser para tratar la infección por *S. aureus* en sitios que incluyen infección de la piel, músculo, cardíaco, tracto respiratorio, tracto gastrointestinal, ojo, riñón y tracto urinario, e infecciones óseas o articulares

En una realización, el uso es tratar la osteomielitis mediante la administración de una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo o la composición farmacéutica de la presente invención a un paciente que tiene una infección ósea o articular por *S. aureus*. La administración de estos agentes o composiciones puede realizarse utilizando cualquiera de las vías que se han descrito anteriormente; sin embargo, se prefiere la administración directamente al sitio de la infección ósea o articular.

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, una porción de unión a antígeno, o una composición farmacéutica de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía en el que la cirugía comprende introducir un implante ortopédico en un paciente que necesita un implante ortopédico y en el que el implante ortopédico está revestido o tratado con el anticuerpo monoclonal, la porción de unión a antígeno o la composición farmacéutica antes, durante o inmediatamente después de la implantación.

En una divulgación, el método de introducción de un implante ortopédico incluye administrar al paciente que necesita el implante ortopédico una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión o una composición farmacéutica que contiene el mismo, directamente al sitio del implante. En la presente invención, o además, el implante ortopédico está revestido o tratado con el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno, o una composición farmacéutica que contiene el mismo antes, durante o inmediatamente después del implante del mismo en el sitio de implante.

El implante ortopédico puede ser una prótesis articular, un injerto o implante sintético. La prótesis articular a modo de ejemplo incluye, sin limitación, una prótesis de rodilla, prótesis de cadera, prótesis de dedo, prótesis de codo, prótesis de hombro, prótesis temperomandibular y prótesis de tobillo. También pueden usarse otras prótesis. Los injertos o implantes sintéticos a modo de ejemplo incluyen un disco intervertebral artificial, implante de menisco, o un ligamento cruzado anterior sintético o de aloinjerto, ligamento colateral tibial, ligamento colateral lateral, ligamento cruzado posterior, tendón de Aquiles, y un manguito rotador. También pueden usarse otros injertos o implantes.

En una realización, el método de introducción de un implante ortopédico está diseñado para incluir el proceso de instalar una revisión de reemplazo de articulación total. Cuando se produce una infección, particularmente una infección por *Staph* de un reemplazo de articulación original, el único tratamiento viable es una revisión de reemplazo de articulación total. En esta realización, la prótesis articular infectada se extrae en primer lugar y después el paciente se trata para la infección subyacente. El tratamiento de la infección tiene lugar durante un extenso periodo de tiempo (es decir, 6 meses), tiempo durante el cual el paciente está inmóvil (o tiene únicamente una movilidad limitada) y recibe altas dosis de antibióticos para tratar la infección subyacente y opcionalmente uno o más anticuerpos monoclonales o porciones de unión, o composiciones farmacéuticas de la presente invención. Tras el tratamiento de la infección subyacente, se instala la nueva prótesis articular. Inmediatamente antes (es decir, en las dos semanas que preceden a la instalación de la nueva prótesis articular) y opcionalmente posterior a la instalación de la nueva prótesis articular, se administra al paciente uno o más anticuerpos monoclonales o porciones de unión a antígeno, o composiciones farmacéuticas de la presente invención. Este tratamiento puede repetirse una o más veces durante el periodo posterior a la instalación. Puede administrarse un tratamiento antibiótico en combinación con o concurrentemente con el uno o más anticuerpos monoclonales o porciones de unión a antígeno, o composiciones farmacéuticas de la presente invención. Estos tratamientos son eficaces para prevenir una infección o reinfección durante la revisión de reemplazo de articulación total.

Los usos de acuerdo con la presente invención pueden ser tratar a cualquier paciente que lo necesite, sin embargo, los usos son particularmente útiles para pacientes inmunodeprimidos de cualquier edad, así como pacientes que tienen más de 50 años.

Ejemplos

La presente invención se ilustra por referencia a los siguientes ejemplos. En la medida en que cualquiera de los ejemplos esté dentro del alcance de la presente invención, se incluyen simplemente para fines de referencia.

Ejemplo 1 - Un modelo transtibial murino de osteomielitis

La OM asociada a implante ortopédico se produce tanto para dispositivos intramedulares (es decir, prótesis articulares) como para implantes transcorticales (es decir, dispositivos de fijación externos, figura 1A). Aunque la tasa de infección de los dispositivos de fijación es 2,5 veces mayor, y tiene una incidencia de más de 8 veces la de las prótesis articulares totales, no se considera que sea tan grave porque la cirugía de revisión es mucho más sencilla (Darouiche, "Treatment of Infections Associated With Surgical Implants", N. Engl. J. Med. 350(14): 1422-9 (2004)). Si bien la mayoría de los casos que involucran un implante transcortical infectado pueden resolverse en una única cirugía para reubicar el clavo y tratar el absceso de forma independiente, la mayoría de las prótesis infectadas deben someterse a dos cirugías de revisión (Darouiche, "Treatment of Infections Associated With Surgical Implants", N. Engl. J. Med. 350(14): 1422-9 (2004)). La primera es necesaria para curar la infección, y la segunda reemplaza la prótesis. Por lo tanto, desde el punto de vista de la importancia clínica, el campo se ha centrado principalmente en modelos de OM asociada a implante que implican un dispositivo intramedular con la cepa UAMS-1 (ATCC 49230) de *S. aureus* (Daum y col., "A Model of Staphylococcus aureus Bacteremia, Septic Arthritis, and Osteomyelitis in Chickens", J. Orthop. Res. 8(6): 804-13 (1990); Rissing et al., "Model of Experimental Chronic Osteomyelitis in Rats", Infect. Immun. 47(3): 581-6 (1985); Passl et al., "A Model of Experimental Post-Traumatic Osteomyelitis in Guinea Pigs", J. Trauma 24(4): 323-6 (1984); Worlock et al., "An Experimental Model of Post-Traumatic Osteomyelitis in Rabbits", Br. J. Exp. Pathol. 69(2): 235-44 (1988); Varshney et al., "Experimental Model of Staphylococcal Osteomyelitis in Dogs", Indian J. Exp. Biol. 27(9): 816-9 (1989); Kaarsemaker et al., "New Model for Chronic Osteomyelitis With Staphylococcus aureus in Sheep", Clin. Orthop. Relat. Res. 339: 246-52 (1997)). Desafortunadamente, este enfoque tiene limitaciones significativas, sobre todo la incapacidad de generar lesiones (temporales y espaciales) reproducibles. En un esfuerzo por superar esto, la localización de la infección fue guiada a la diáfisis por la fractura de la tibia inmediatamente después de la inserción de un clavo intramedular que contiene 1×10^6 UFC, usando un dispositivo Einhorn como se ha descrito previamente (Zhang et al., "Cyclooxygenase-2 Regulates Mesenchymal Cell Differentiation Into the Osteoblast Lineage and is Critically Involved in Bone Repair", J. Clin. Invest. 109(11): 1405-15 (2002)). Se descubrió que la implantación de un clavo transcortical infectado siempre produce lesiones adyacentes al clavo, y nunca da lugar a una OM crónica en otras regiones de la tibia o la propagación hematogena en ratones (figuras 1A-C).

Para cuantificar la osteólisis, se realizó un estudio en el tiempo en el que las tibias infectadas se analizaron por μ CT (figuras 1B-C). Estos resultados son consistentes con la formación de secuestros en la que la resorción ósea osteoclástica en torno al implante infectado se produce con la formación de hueso perióstico reactivo concomitante.

La presencia de OM en los ratones se confirmó histológicamente. Las figuras 2A-H demuestran que el modelo de clavo transcortical tibial contiene todas las características sobresalientes de la OM crónica, incluyendo: formación de secuestro e involucro, resorción osteoclástica del hueso cortical y bacterias extracelulares teñidas con Gram y biopelícula que residen en el hueso necrótico que rodea al implante. Ninguno de los controles negativos, incluyendo *S. aureus* muerto por calor y *E. coli* no patógeno, demostró estas características.

Ejemplo 2 - Cuantificación por PCR en tiempo real de osteomielitis

No existen métodos conocidos para cuantificar la OM. Dado que es imposible extraer eficazmente bacterias vivas de hueso infectado para determinar la carga bacteriana por unidades formadoras de colonias (UFC) clásicas, se desarrolló un método de PCR en tiempo real para cuantificar el número de genes *nuc* recuperables en muestras de ADN, como se hace para ensayar la contaminación en el queso (Hein et al., "Comparison of Different Approaches to Quantify Staphylococcus aureus Cells by Real-Time Quantitative PCR and Application of This Technique for Examination of Cheese", *Appl. Environ. Microbiol.* 67(7): 3122-6 (2001)) y la sangre (Palomares et al., "Rapid Detection and Identification of Staphylococcus aureus From Blood Culture Specimens Using Real-Time Fluorescence PCR", *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45(3): 183-9 (2003)), como medida de resultado sustitutiva de la carga bacteriana.

El análisis por RTQ-PCR para el gen *nuc* específico de *S. aureus* puede realizarse usando los cebadores 5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT -3' (SEQ ID NO: 15) y 5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAA -3' (SEQ ID NO: 16) que amplifican un producto de 269 pb que se ha descrito previamente (Hein et al., "Comparison of Different Approaches to Quantify Staphylococcus aureus Cells by Real-Time Quantitative PCR and Application of This Technique for Examination of Cheese", *Appl. Environ. Microbiol.* 67(7): 3122-6 (2001)). Las reacciones pueden realizarse en un volumen final de 20 μ l que consistía en cebadores de 0,3 μ M, 1 x Sybr Green PCR Super Mix (BioRad, Hercules, CA), y 2 μ l de la plantilla de ADN de tibia purificada. Las muestras pueden ensayarse usando un Rotor-Gene RG 3000 (Corbett Research, Sydney, AU).

Para controlar la integridad de la plantilla de ADN entre las muestras, también puede realizarse un análisis por RTQ-PCR para el gen β -actina de ratón que detecta un producto de 124 pb usando los cebadores 5'-AGATGTGAATCAGCAAGCAG-3' (SEQ ID NO: 17) y 5'-GCGCAAGTTAGGTTTTGTCA-3' (SEQ ID NO: 18). Usando los cebadores de PCR específicos para β -actina murina, *S. aureus nuc*, y ADN genómico de ARNr, se demostró la especificidad de estas PCR y la capacidad de amplificar los productos predichos (Li et al., "Quantitative Mouse Model of Implant-Associated Osteomyelitis and the Kinetics of Microbial Growth, Osteolysis, and Humoral Immunity", *J. Orthop. Res.* 26(1): 96-105 (2008)). Después, usando el ADN plasmídico purificado que contenía el gen *nuc*, o ADN genómico de *S. aureus*, se realizó un experimento de dosis-respuesta y se determinó que el límite de detección para esta RTQ-PCR es de ~100 copias (Li et al., "Quantitative Mouse Model of Implant-Associated Osteomyelitis and the Kinetics of Microbial Growth, Osteolysis, and Humoral Immunity", *J. Orthop. Res.* 26(1): 96-105 (2008)). Se ha usado este ensayo para cuantificar la carga bacteriana *in vivo* como una medida de resultado secundaria de infección y eficacia de la inmunización pasiva.

Ejemplo 3 - Cinética de la infección e inmunidad humoral durante el establecimiento de la osteomielitis

Para cuantificar la patogénesis microbiana y la inmunidad del huésped durante el establecimiento de la osteomielitis, se realizó un estudio de tiempo en el que a los ratones se les puso un implante de clavo transcortical infectado en su tibia, y la carga bacteriana y la respuesta humoral del huésped se determinaron con el tiempo mediante RTQ-PCR y transferencia Western de *nuc*/ β -actina, respectivamente (figuras 3A-C). Los resultados indican una clara correlación inversa entre la infección y la inmunidad humoral. De acuerdo con la patogénesis microbiana clásica y la inmunidad adquirida a las bacterias extracelulares, estos resultados indican que las bacterias se establecen inmediatamente y entran en una fase de crecimiento exponencial, que se extingue por una respuesta humoral neutralizante después de 11 días. Basándose en la coincidencia de la carga bacteriana máxima con la génesis de anticuerpos IgG de alta afinidad contra proteínas bacterianas específicas, es evidente que estos antígenos "inmuno-dominantes" provocan una respuesta inmune funcional que es tanto diagnóstica como protectora frente al establecimiento de OM.

Ejemplo 4 - Identificación y clonación de la subunidad de glucosaminidasa de autolisina de *S. aureus* como un antígeno inmunodominante de 56 kDa que provoca una respuesta de IgG2b específica durante el establecimiento de OM

Para caracterizar adicionalmente la respuesta humoral durante el establecimiento de OM, se determinó la prevalencia de isotipos de Ig en el suero de ratones durante las primeras dos semanas de infección por ELISA (Li et al., "Quantitative Mouse Model of Implant-Associated Osteomyelitis and the Kinetics of Microbial Growth, Osteolysis, and Humoral Immunity", *J. Orthop. Res.* 26(1): 96-105 (2008)). Los resultados mostraron que los ratones inician una respuesta de IgM clásica en la primera semana que se convierte en una respuesta de IgG2b específica en la segunda semana, que recientemente ha demostrado tener potentes actividades opsonicas y protectoras contra los antígenos de *S. aureus* (Maira-Litran et al., "Comparative Opsonic and Protective Activities of Staphylococcus aureus Conjugate Vaccines Containing Native or Deacetylated Staphylococcal Poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine", *Infect. Immun.* 73(10): 6752-62 (2005)).

Para elucidar la identidad molecular de los antígenos inmuno-dominantes identificados en la figura 3C, se realizó una transferencia Western sustractiva de extracto total de *S. aureus* que se separó mediante 2D-PAGE (figuras 4A-C). Este análisis reveló un polipéptido que no se detectó por el suero preinmune, pero tenía una fuerte reactividad con el suero post-inmune del día 14. La proteína se aisló a partir de un gel tenido de azul de Coomassie preparativo, se digirió con tripsina y se analizó por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), que resolvió 70 picos

peptídicos individuales. La secuencia aminoacídica de cada péptido era una coincidencia del 100 % con la secuencia conocida de la subunidad Gmd de *S. aureus* *Alt*. Curiosamente, otros también han descubierto recientemente que *Atl* es un antígeno inmuno-dominante en un modelo de tibia de conejo de OM MRSA (Brady et al., "Identification of Staphylococcus aureus Proteins Recognized by the Antibody-Mediated Immune Response to a Biofilm Infection", *Infect. Immun.* 74(6): 3415-26 (2006)).

Para confirmar que el punto escogido del gel 2D-PAGE en la figura 4C era el antígeno inmuno-dominante relevante, se generó una proteína de fusión marcada con 6-His recombinante clonando la región codificante de 1.465 pb de la subunidad de glucosaminidasa de 53 kDa de autolisina de *S. aureus* en el sitio XhoI-BamHI del plásmido de expresión pET-28a(+) (Novagen), que contiene el promotor lac I para la inducción de IPTG. Después de la secuenciación del ADN, se usó el plásmido para transformar *E. coli* BL21, que se usó para producir His-glucosaminidasa (His-Gmd) recombinante. Después, esta proteína recombinante se utilizó para evaluar la reactividad de sueros pre-inmunes e inmunes. Los resultados mostraron que la proteína recombinante de 57 kDa inducida por IPTG sólo es reconocida por el suero inmune, confirmando así que Gmd es un antígeno inmuno-dominante de *S. aureus*. Este experimento se repitió con anti-sueros de ratones infectados con Xen 29, y se confirmó que C57B1/6 también generan anticuerpos específicos de Gmd contra esta cepa bioluminiscente de *S. aureus*.

Ejemplo 5 - Formación de imágenes por bioluminiscencia *in vivo* de *S. aureus* transformado por *lux* como una medida de resultado longitudinal de OM y crecimiento bacteriano

Aunque el método por RTQ-PCR de cuantificación de OM en un modelo de ratón es muy útil, hay tres limitaciones principales a este enfoque. En primer lugar, no es longitudinal, ya que el análisis requiere el sacrificio de los ratones para cosechar el ADN. En segundo lugar, es muy laborioso y requiere un gran cuidado durante el aislamiento del ADN, el análisis por PCR y el análisis de datos. En tercer lugar, la detección del ADN genómico de *S. aureus* (genes *nuc*) no puede distinguir entre las bacterias que están en una fase de crecimiento activo frente a las bacterias latentes empaquetadas de forma estanca en una biopelícula. Por lo tanto, el análisis por RTQ-PCR no se puede usar fácilmente para evaluar el efecto de mAb sobre el crecimiento bacteriano *in vivo*.

Para superar estos inconvenientes, la presente invención se refiere a un enfoque altamente innovador para controlar patógenos *in vivo* usando imágenes de bioluminiscencia (Contag et al., "Photonic Detection of Bacterial Pathogens in Living Hosts", *Mol. Microbiol.* 18(4): 593-603 (1995)). Más recientemente, P. R. Contag y col. han generado *S. aureus* bioluminiscente (Xen 29, ATCC 12600) para este fin (Francis et al., "Monitoring Bioluminescent Staphylococcus aureus Infections in Living Mice Using a Novel luxABCDE Construct", *Infect. Immun.* 68(6): 3594-500 (2000)). Las figuras 5A-B demuestran cómo este enfoque se adapta en el modelo de OM de la presente invención. En estudios de transcurso de tiempo con Xen29, sólo se detectó la señal de fondo en ratones que recibieron un clavo estéril o ratones infectados tratados con gentamicina parenteral. Por el contrario, el BLI de tibias infectadas no tratadas demostró un fuerte aumento de 4 veces desde el inicio en el día 4, que posteriormente descendió a niveles de fondo por el día 11.

Ejemplo 6 - La vacuna de Gmd recombinante protege a los ratones de OM asociada a implante

Para evaluar el potencial de una inmunización pasiva anti-autolisina para OM, se realizó un estudio de la vacuna de Gmd recombinante activa inicial en el que se inmunizaron ratones (n = 20) como se indica a continuación: Grupo 1 (PBS en adyuvante (control negativo)); Grupo 2 (20 µg de extracto de proteoma total de *S. aureus* Xen 29 emulsificado 1:1 con un volumen igual de adyuvante (control positivo)); Grupo 3 (20 µg de His-glucosaminidasa en adyuvante). Una emulsión de 150 µl de cada vacuna se inyectó por vía intramuscular (i.m.) 28 días antes de la exposición. Se realizaron inmunizaciones de refuerzo (i.m.; 20 µg de proteína en adyuvante incompleto de Freund) 14 días antes de la estimulación.

Para evaluar la eficacia de la vacuna en estos ratones, se desarrolló un ELISA anti-Gmd (figura 6A) y se usó para cuantificar los títulos de anticuerpos séricos antes de la inmunización inicial, antes de la inmunización de refuerzo, y antes de la estimulación bacteriana (figura 6B). Sorprendentemente, los resultados demostraron que sólo la vacuna recombinante provocó una respuesta inmune de alto título. Para evaluar la eficacia de estas vacunas, los ratones inmunizados se estimularon con un clavo transtibial infectado con Xen29 como se ha descrito en el Ejemplo anterior (véase la figura 5A-C), se realizó BLI el día 3, y los ratones se sometieron a eutanasia para RTQ-PCR *nuc* el día 11. Sorprendentemente, 18 de los 20 ratones inmunizados con proteoma total de *S. aureus* murieron a las 48 horas de la estimulación; por lo tanto, los datos de eficacia de ese grupo no están disponibles. Aunque sólo se pueden proporcionar explicaciones especulativas para esta observación (es decir, hiperinmunidad frente a otros antígenos), el hecho de que no se haya producido muerte en ninguno de los otros grupos y de que las muertes se hayan reproducido en las 4 cohortes de 5 ratones del Grupo 2 indica que los resultados son reales. Por esta razón, este protocolo de inmunización no debe usarse como un control positivo para futuros estudios. También destaca las preocupaciones de seguridad con las vacunas activas, y apoya la razón de una inmunización pasiva con mAb purificado o fragmentos de unión del mismo.

Los datos de BLI y RTQ-PCR *nuc* de los Grupos 1 y 3 se presentan en las figuras 7A-C. Los resultados demuestran claramente una reducción significativa de BLI detectada en los ratones inmunizados His-Gmd (figuras 7A-B), que muestra una disminución en el crecimiento planctónico de las bacterias. De acuerdo con este hallazgo, se observó que hubo una reducción significativa en el número de genes *nuc* en el pico de la carga bacteriana en este modelo (día 11). Por lo tanto, estos datos demuestran que la vacuna de Gmd recombinante puede proteger a ratones de OM en el modelo.

Ejemplo 7 - Generación y cribado de anticuerpos monoclonales Anti-Gmd de ratón

Basándose al éxito de la inmunización His-Gmd que se ha descrito en el Ejemplo 6, este protocolo se usó para generar mAb anti-Gmd de ratón. Se usaron procedimientos estándar para generar el mAb. A partir de un grupo inicial de hibridomas que se prepararon, se seleccionó un primer subconjunto seleccionado por ELISA para la actividad anti-Gmd y se seleccionó un segundo subconjunto que poseía mayor afinidad después de un ensayo de transferencia Western.

Cinco de las líneas celulares de hibridoma se seleccionaron basándose en su aparente alta afinidad por Gmd ($\leq 10^{-9}$ M) y el supuesto epítipo para estas regiones que se encuentra dentro del dominio R3 de Gmd. Debido a que el dominio R3 no es el dominio catalítico de la proteína Gmd, era inesperado que estos anticuerpos monoclonales poseyeran una actividad inhibidora significativa anti-Gmd. Los cinco hibridomas seleccionados eran 1C11, 1E12, 2D11, 3A8 y 3H6. Todos anticuerpos de IgG1 de ratón secretados.

Ejemplo 8 - Alteración de crecimiento *in vitro* de Xen29 de *Staphylococcus aureus* por anticuerpos monoclonales anti-glucosaminidasa

Se obtuvieron alícuotas congeladas de cada línea celular (1C11, 1E12, 2D11, 3A8 y 3H6) directamente del proveedor que las preparó a petición nuestra (Precision Antibodies, Inc., Columbia, MD). Las células congeladas se descongelaron y después se lavaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con 50 µg/ml de gentamicina y suero fetal bovino al 10 % (FBS). El sobrenadante del cultivo cosechado se aclaró por centrifugación (10 min, 1000 x g) y se congeló.

Se descongelaron 30 ml de sobrenadante de cultivo de cada línea celular a 37-45 °C y se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm. Después, cada uno se purificó en una columna de proteína G-agarosa de volumen de lecho de 5 ml (GE Healthcare HiTrap™ Protein G HP, Cat. N.º 17-0405-03, Lote N.º 10036021). En el lugar de la bomba para la que se diseñan estas columnas, se añadieron fluidos por medio de jeringas luer-lock montadas por adaptadores en la parte superior de la columna. La columna se lavó en primer lugar con PBS para eliminar el conservante de etanol y después se añadieron sobrenadantes de cultivo a 5-6 ml/min seguido de seis volúmenes de columna de PBS para lavar la proteína no unida. El anticuerpo adsorbido se eluyó con dos volúmenes de columna de glicina 0,1 M, pH 2,7, en un recipiente de recogida que contenía 1 ml de Tris 1,0 M, pH 8,0, para neutralizar el producto eluido. Después, la columna se lavó con cuatro volúmenes de columna de PBS en preparación para el siguiente anticuerpo, o con PBS que contenía NaN3 al 0,02 % para el almacenamiento.

Los anticuerpos eluidos se concentraron y se dializaron en PBS en concentradores Pierce® (Thermo Scientific 7 ml/20K MWCO, Cat. N.º 87750, lote n.º KH137631A) mediante centrifugaciones sucesivas a 3500 x g, 40 min, 4 °C. La concentración de anticuerpos se determinó mediante ELISA usando MOPC21 o Phe12.15 (ambas IgG1 de ratón) como patrones. Se adsorbió IgG anti-ratón de cabra no marcada (Southern Biotechnology Cat. N.º 1030-01) en placas de microtitulación NUNC Maxisorp de 96 pocillos a 5 µg/ml en PBS, 100 µl por pocillo, una hora TA o durante una noche a 4 °C. Los pocillos se bloquearon mediante la adición de 200 µl de BSA al 3 % en PBS durante una hora a TA o durante una noche a 4 °C. Las placas bloqueadas se lavaron dos veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % (PBST) y listas para usar. Las muestras se prepararon como diluciones en serie en PBST y se añadieron 100 µl a los pocillos designados para patrones y muestras. Las muestras se incubaron durante una hora, TA, y después se lavaron 4 veces con PBST de una botella rociadora. El anticuerpo de ratón capturado se detectó mediante la adición a cada pocillo de 100 µl de IgG de cabra anti-ratón conjugado con HRP (HRP-GAM, Southern Biotechnology, Cat. N.º 1031-05), diluido a 1:2000 en PBST, e incubado durante una hora, TA. Después de lavar las placas 4 veces con PBST de una botella de chorros, se añadió el substrato de HRP cromatográfico ABTS (Southern Biotechnology, Cat. N.º 0401-01), 100 µl por pocillo. Se dejó que el color se desarrollara durante 5-10 minutos, TA. Las concentraciones de anticuerpos se determinaron proyectando valores de color de muestra sobre las curvas estándar y después corrigiendo la dilución. Estas concentraciones se utilizaron para estudios de titulación para determinar su efecto sobre el crecimiento de *S. aureus*.

Xen29 de *S. aureus* (Kadurugamuwa et al., "Rapid Direct Method for Monitoring Antibiotics in a Mouse Model of Bacterial Biofilm Infection", *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3130-7 (2003) y Kadurugamuwa et al., "Noninvasive Optical Imaging Method to Evaluate Postantibiotic Effects on Biofilm Infection In Vivo", *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2283-7 (2004)) era la única cepa bacteriana usada en estos experimentos. Se recogió 1 µl de Xen29 de *S. aureus* de una reserva congelada y se cultivó en 10 ml de medio LB a 37 °C en una plataforma giratoria a 200 rpm durante 12 horas con respecto a una fase semi-logarítmica. Después, las bacterias se diluyeron en medio LB a 1000 ufc/ml y se añadieron 100 µl de la suspensión diluida a los pocillos de una microtitulación de fondo plano (con

cubierta) diseñada para la adición de los anticuerpos y controles. Cada anticuerpo anti-Gmd y de control se diluyó en LB de reservas de aproximadamente 1 mg/ml en PBS y se esterilizó a través de un filtro de 0,2 μ . Se añadieron 100 μ l de cada anticuerpo a los pocillos cuadruplicados designados. Después, las placas se incubaron después a 37 °C y se midió la dispersión de la luz a 490 y 670 nm a t = 0, 5, 7, 9, 11, 13, 15 horas en un lector de placas de microtitulación. Se tomó un punto de tiempo final después de 24 horas para confirmar los valores de meseta medidos.

Los cinco anticuerpos se purificaron por cromatografía de afinidad sobre Proteína G-Agarosa, se concentraron a 1 mg/ml en PBS y se dializaron para eliminar conservantes tales como NaN₃ y antibióticos que podrían interferir en el ensayo. Se pusieron 100 ufc de la cepa Xen29 de *S. aureus* de un cultivo en fase semi-logarítmica en cada pocillo de microtitulación en medio LB junto con 100 μ l de cada anticuerpo o control (también en medio LB) a 50 μ g/ml ($\sim 3 \times 10^{-7}$ M). El crecimiento se controló midiendo la dispersión de la luz a 490 y 670 nm a intervalos de más de 26 horas.

La reducción aparente en el crecimiento de *S. aureus* se observó mediante anticuerpos monoclonales anti-Gmd. Como se representa en la figura 8, cuatro de los anticuerpos deprimieron el aumento relacionado con el crecimiento en la dispersión de la luz de Xen29. Los cuatro anticuerpos que redujeron la dispersión de la luz lo hicieron en el mismo grado mientras que el control apareado de los isotipos (MOPC21) era idéntico al Xen29 cultivado en ausencia de cualquier anticuerpo. El quinto anticuerpo, 3H6, también demostró un comportamiento similar en un experimento separado.

También se observó que la alteración de la dispersión de luz relacionada con el crecimiento de Xen29 es dependiente de la dosis y consistente con la interacción de alta afinidad entre anticuerpos monoclonales y Gmd nativo. La decisión crítica para abordar la dependencia de la dosis de la alteración del crecimiento observada de Xen29 fue si la reducción aparente en el crecimiento de Xen29 se reveló sólo parcialmente debido a que la concentración de anticuerpo era demasiado baja o el efecto máximo ya se observó y concentraciones más altas no tendrían ningún efecto adicional

Debido a que cuatro de los anticuerpos tenían la misma magnitud de efecto y 50 μ g/ml (3×10^{-7} M) era una concentración muy alta, los niveles de anticuerpos se redujeron a partir de 50 μ g/ml en diluciones seriadas de $10^{0,5}$. Los datos representativos se presentan en la figura 9. El anticuerpo monoclonal 1C11 alteró el crecimiento de Xen 29 al mismo grado a 50, 16 y 5 μ g/ml, parcialmente a 1,6 ($\sim 1 \times 10^{-8}$ M), y no fue diferente del anticuerpo irrelevante MOPC21 a 0,5 μ g/ml (figura 10). Se obtuvieron resultados esencialmente idénticos para los mAbs 2D11, 1E12 y 3A8.

Los resultados para el anticuerpo de control apareado al isotipo MOPC21 se presentan en la figura 10. Las curvas de crecimiento eran básicamente idénticas al control sin anticuerpo. La ligera elevación de las muestras de 50 μ g/ml se debió a su colocación en pocillos externos en la placa de microtitulación (efecto de borde).

Suponiendo que la inhibición de Gmd se debe a un alto grado de unión a anticuerpo, entonces una estimación que asume que se requiere aproximadamente diez veces el K_d pone la afinidad operativa para la Gmd en la proximidad de 1 nM.

Estos datos indican que los cuatro mAb anti-Gmd inhiben la actividad de Gmd, conduciendo a un cambio en el patrón de crecimiento *in vitro* de Xen29, pero no tienen efecto sobre el tiempo de duplicación. La inhibición de la actividad de Gmd conduce a una citocinesis fallida, es decir, el genoma y las membranas celulares se dividen normalmente, pero las paredes celulares no se separan conduciendo a grandes grupos de células agregadas (Sugai et al., "Identification of Endo-beta-N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-alanine Amidase as Cluster-dispersing Enzymes in *Staphylococcus aureus*", *J Bacteriol* 177: 1491-6 (1995)). Este cambio es detectable por dispersión de luz porque hay menos centros de dispersión (aunque mayores) que cuando las células Xen29 se dividen libremente.

Ya se ha demostrado que los anticuerpos de la presente invención satisfacen varios criterios clave. Estos son anticuerpos de IgG de alta afinidad producidos por los hibridomas parentales a niveles robustos (~ 50 μ g/ml en cultivo estático). Reconocen los epítomos conservados y, en consecuencia, algunos o la mayoría reconocerán Gmd de la mayoría de cepas de *S. aureus*. Además, estos experimentos proporcionan evidencia de que estos anticuerpos monoclonales reconocen Gmd nativo y no meramente la His-Gmd recombinante que se usó como le inmunógeno, y que actúan como inhibidores de Gmd. Todos los anticuerpos monoclonales muestran una actividad inhibidora de Gmd de entre aproximadamente el 70 a aproximadamente el 80 por ciento. Este nivel de actividad inhibidora de Gmd es bastante sorprendente dado que los cinco anticuerpos seleccionados se unen a epítomos situados dentro del dominio R3 de Gmd en lugar de su dominio catalítico.

Ejemplo 9 - Los anticuerpos monoclonales específicos para glucosaminidasa de *Staphylococcus aureus* usan una matriz diversa de genes V_H

Para determinar que los cinco anticuerpos monoclonales bajo investigación eran únicos, se determinaron las secuencias de los genes V_H y V_L para los cinco hibridomas candidatos (1C11, 1E12, 2D11, 3A8 y 3H6) identificados

en el ejemplo anterior.

Debido a que existen considerables aplicaciones y ventajas médicas en el estudio de cada uno de un conjunto de anticuerpos monoclonales específicos para la glucosaminidasa de *S. aureus* (Gmd), es beneficioso identificar hibridomas que expresan anticuerpos idénticos (sibs). Se seleccionaron cinco hibridomas para el análisis de secuencia de sus genes de cadena pesada y ligera de Ig.

Se obtuvieron alícuotas congeladas de cinco líneas celulares de hibridoma del proveedor A&G Precision Antibody™ (9130 Red Branch Road, Suite U, Columbia, MD 21045), que prepararon los hibridomas en nuestra dirección. Las células se descongelaron, se lavaron en DMEM con gentamicina y FBS al 10 % para eliminar el DMSO, y después se cultivaron en DMEM con gentamicina y FBS al 10 %. Después de unos pocos días, las células se cosecharon por centrifugación y se almacenaron a -20 °C como un sedimento congelado para una extracción de ARN posterior.

La amplificación por RT-PCR del ARNm de cadena pesada fue exitosa en los cinco hibridomas. El análisis secuencial reveló que se usaron tres segmentos génicos de V_H de línea germinal diferentes. Dos de los hibridomas (2D11 y 3H6) usaron los mismos segmentos V_H y J de la línea germinal, pero los diferentes segmentos D y cada uno mostraron sólo una diversificación de secuencia modesta a partir de la línea germinal a nivel de proteína. La cadena pesada del quinto hibridoma (1C11) no se amplificó inicialmente en RT-PCR incluso con cebadores de PCR diseñados para amplificar algunos de los segmentos génicos de V_H más raramente utilizados. Se puede inferir que expresó un gen V_H de Ig distinto de los otros.

Se extrajo ARN total de células de hibridoma crecientes frescas y ~5 microgramos de ARN se transcribieron de forma inversa usando el kit BioRad iScript. Las alícuotas de ADNc se amplificaron por PCR con cebadores de consenso para los extremos 5' de regiones de cadena pesada y ligera variables de murino emparejadas con cebadores de región constante. Se obtuvieron fuertes productos para genes 4/5 V_H y 5/5 V_L. Los productos de PCR se purificaron en gel y se secuenciaron directamente. Los 4 productos V_H dieron una secuencia limpia, pero se mezclaron 2/4 productos de cadena ligera. Las dos restantes dieron buenas secuencias. La cadena ligera derivada de la línea celular que no proporcionó un producto de cadena pesada no se secuenció. Las regiones variables para los anticuerpos que no pudieron amplificarse en los experimentos iniciales utilizando cebadores de marco 1 se amplificaron satisfactoriamente usando un conjunto de cebadores diferente que se dirige a las regiones líder secretoras de los segmentos génicos variables. Estos productos de PCR también se secuenciaron directamente después de la purificación.

Los mejores apareamientos para los genes de la región V de la línea germinal se determinaron usando BLAST Ig (NCBI). La secuencia de ADN determinada se tradujo en secuencia proteica usando un programa en línea disponible en el sitio web de Expasy. La alineación de secuencias de las secuencias 2D11 y 3H6 se realizó mediante inspección visual.

Como se ha indicado anteriormente, eventualmente los cinco genes V_H se amplificaron y se secuenciaron con éxito. Los resultados detallados de la secuencia de ADN y de proteína para los cinco hibridomas se presentan a continuación.

El hibridoma 2D11 (correspondencia de línea germinal más cercana: J558.18.108) tiene la secuencia nucleotídica V_H (SEQ ID NO: 21) como se indica a continuación:

```
GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGTGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCC
TGTAAGGCTTCTGGATACACATTCACCTGACTACTATATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGA

AAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGTTATTAATCCTTACAACGGTGATACTACCTACAGCCAGAAG
TTC AAGGGCAAGGCCACATTCAGTGTGACAAGTCCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAAC
AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAAATTACGACGAGTACTTCGAT
GTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCAACGCTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTAT
CCACTGGCCCTGGATCTGCTGCCAAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCNGGTCAAG
GGC
```

VL 2D11 (correspondencia de línea germinal más cercana: at4) tiene la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 22) como se indica a continuación:

```
GATATTGTGATGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAACCATG
ACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCC
CCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCGCTTCAGTGGC
AGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAGGATGTGCCACT
TATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTTACCCGCTCACGTTCCGT
```

La secuencia aminoacídica de 2D11 V_H de hibridoma (SEQ ID NO: 1) es como se indica a continuación:

ES 2 606 017 T3

EVQLQESGPVLVKPGASVKMSCKASGYFTFDYYMNWVKQSHGKSLEWIGVINPYNGDFTYSQK
FKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARNYDEYFDVWGTGTTVTVSSAKTTPPSVY
PLAPGSAAQTNMVTLGCVKVG

La 2D11 V_L tiene la secuencia aminoacídica (SEQ ID NO: 8) como se indica a continuación:

5 DIVMTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAGVFPVRFSG
SGSGTSYSLTISRMEAEADAATYYCQQWSSYPLTFG

El hibridoma 3H6 (correspondencia de línea germinal más cercana: J558.18.108) tiene la secuencia nucleotídica V_H (SEQ ID NO: 23) como se indica a continuación:

10 GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGTGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCC
TGTAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTACTTTATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGA
AAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGTTATTAATCCTTCAACGGTGGTAATAGGTACAACCAGAAC
TTCAAGGGCAAGGCCACATGACTGTTGACAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAAC
AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGGGACTATGACTCCCCCTGG
TTTGATTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGCACCCCATCT
GTCTATCCACTGGCCCCGGATCTGCTGCCAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTG
GTCAAGGGCTATTCCNGAGCCAGTG

La 3H6 V_L (correspondencia de línea germinal más cercana: cp9, JK1) tiene la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 24) como se indica a continuación:

15 CAGATGACACAGACTACGTCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGC
AGTGCAAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGT
AAACTCCTGATCTATTACACATCAAGTTTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCGGT
GGGTCTGGGACAGATTATCTCTCTCCATCAGCAACCTGGAACCTGAAGATATTGCCACTTAC
TATTGTCAGCAGTATAGTAAGCTTCCTTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAA

La secuencia aminoacídica del hibridoma 3H6 V_H (SEQ ID NO: 2) es como se indica a continuación:

20 EVQLQESGPVLVKPGASVKLSCKASGYFTFDYFMNWKQSHGKSLEWIGVINPFGNGNRYNQ
FKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARGDYDPSWFDYWGQGLVTVSAAKTPPS
VYPLAPGSAAQTNMVTLGCLVKGYXSQ

La secuencia aminoacídica del hibridoma 3H6 V_L (SEQ ID NO: 9) es como se indica a continuación:

25 QMTQTSSLSASLGDRTVITSCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGG
GSGTDYSLISINLEPEDIATYYCQYSKLPWTFGGGKLEIK

El hibridoma 1E12 (correspondencia de línea germinal más cercana: 7183.46 VH7) tiene la secuencia nucleotídica V_H (SEQ ID NO: 25) como se indica a continuación:

30 GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTCGTGAAGCCTGGAGGTTCCCTGAACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCTATGTCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAA
AAGAGGCTGGAGTGGTTCGCAACCATAGTGATGGTGGTGGTGCATCTACTATCTAGACAAT
GTAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTACCTGCACATGAGC
CATCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGCTTACTACGGTAGTAGTTAC
GACGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCC
CCATCTGTCTATCCACTGGCCCCGGATCTGCTGCCAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGA
TGCTTGGTCAAGGGC

La 1E12 V_L (correspondencia de línea germinal más cercana: ai4) tiene la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 26) como se indica a continuación:

35 GATATGTGATCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAACGGGTACCATG
ACCTGCAGCTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCAGTACTTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGA
TCTTCCCCAACTNTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTC
AGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCT
GCCACTTATTACTGCCACCAGTATCATCGTTCCCCATGGACGTTCCGGTGGAGGCACC

La secuencia aminoacídica del hibridoma 1E12 V_H (SEQ ID NO: 3) es como se indica a continuación:

EVQLQESGGGFVKPGSLKLSAASGFTFSTYVMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGGHYYLDN
VKGRFTISRDNKNNLYLHMSHLKSEDTAMYYCARAYYSSYDAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTP
PSVYPLAPGSAAQTNMVTLGCLVKV

ES 2 606 017 T3

El 1E12 VL tiene la secuencia aminoacídica (SEQ ID NO: 10) como se indica a continuación:

```
DIVITQSPATMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKXWIYSTSNLASGVPARF  
SGSGSGTSYSLTISSMEAEADAATYYCHQYHRSPTWTFGGGT
```

5 El hibridoma 3A8 (correspondencia de línea germinal más cercana: VHJ606.4.8.2) tiene la secuencia nucleotídica VH (SEQ ID NO: 27) como se indica a continuación:

```
GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCACCTGGAGGATCCATGAAACTCTCT  
TGTGCTGCCTCTGGATTCACTTTTAGTGACGCCTGGATGGACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAG  
AAGGGGCTTGAGTGGGTGCTGAAATTAAGACAAAATAAATCATGCAACATACTATGCT  
GAGTCTGTGAAAGGGAGGTTCAACCATCTCAAGAGATGTTTCCAAAAGTCGTGTCTCTCGTCAA  
ATGAACAGCTTAAGACCTGAAGACACTGGCATTATTACTGTACGTCTGGCCATATTTGAC  
TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTAT
```

10 CCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCAAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAG
GGCTATTTCCCTGAG

El 3A8 VL (correspondencia de línea germinal más cercana: KV 19-25, JK2) tiene la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 28) como se indica a continuación:

```
GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATC  
ACCTGCAAGGCCAGTCAGGACGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAAAACCAGGGCAA  
TCTCTAAACTACTGATTACTGGACATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTACACA  
GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTAAAGACCTGGCA  
CTTTATTACTGTGACCAACATTATACCACTCCGTACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAA  
ATAAAA
```

15

La secuencia aminoacídica del hibridoma 3A8 VH (SEQ ID NO: 4) es como se indica a continuación:

```
EVQLQESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTTFSDAWMDVWRQSPKGLWVAEIKDKTNNHATYYA  
ESVKGRFTISRDKSRVFLQMNSLRPEDTGIYYCTSGPYFDYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVY  
PLAPGSAAQTNMVTGLCLVKGYFPE
```

20

La secuencia aminoacídica del hibridoma 3A8 VL (SEQ ID NO: 11) es como se indica a continuación:

```
DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWTSTRHTGVPDRFT  
SGSGGTDFTLTISVQAKDLALYYCQQHYTTPYTFGGGKLEIK
```

25 El hibridoma 1C11 (correspondencia de línea germinal más cercana: VH 9-15, DST4-C57B1-6, JH3) tiene la secuencia nucleotídica VH (SEQ ID NO: 29) como se indica a continuación:

```
CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCC  
TGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCAACAGTATGGAATGAGCTGGGTGAATCAGGTCACAGGA  
AAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTACTCTGGAGTGCCAACATATGCTGATGAC  
TTCAAGGGACGGTTTGTCTTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGATCAAC  
AACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGAGAGGAGTACAGCTCAGGCTAC  
CGCGCCTGGTTTCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
```

30 El 1C11 VL (correspondencia de línea germinal más cercana: VK23-43, JK5) tiene la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 30) como se indica a continuación:

```
GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAGTCTT  
TCTGCAGGGCCAGCCAAAGTATTAGCAACAACCTACACTGGTATCAACAAAATCACATGAG  
TCTCAAGGCTTCTCATCGAATATGCTTCCCGGTCCATCTCTGGGATCCCCTCTAGGTTTCA  
GGGGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATTTTGG  
TTGTATTTCTGTCAACAGAGTAACAGCTGGCCGCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAG  
CTGAAA
```

35 La secuencia aminoacídica del hibridoma 1C11 VH (SEQ ID NO: 5) es como se indica a continuación:

```
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTTYYGMSVWNQAPGKGLKMMGWINTYSGVPTIYADD  
FKGRFVFSLETSASTAYLQINNLKNETATYFCAREEYSSGYAAWFPYWGQGLTVTVSA
```

40 La secuencia aminoacídica del hibridoma 1C11 VL (SEQ ID NO: 12) es como se indica a continuación:

```
DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSISSNNLHWYQQKSHESPRLLEIYASRSISGIPSRFS  
GGSGGTDFTLSINSVESEDFGLYFCQQSNSWPLTFGAGTKLELK
```

A partir de las secuencias obtenidas, el ajuste más cercano para los segmentos génicos de la línea germinal V_H y V_L se determinó como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Correspondencias de línea germinal para líneas celulares de hibridoma secuenciado

Hibridoma	Línea germinal V _H	Línea germinal V _L
1C11	VH 9-15, DST4-C57B1-6, JH3	VK23-43, JK5
1E12	7183.46 VH7	ai4
2D11	J558.18.108	at4
3A8	VHJ606.48.2	KV 19-25, JK2
3H6	J558.18.108	cp9, JK1

5 Cada uno de los cinco hibridomas expresó un gen V_H único. La figura 11 muestra la alineación de los cuatro genes V_H inicialmente secuenciados, y la figura 13 muestra la alineación de los cinco genes V_H secuenciados. La figura 15 muestra la alineación de los genes V_H secuenciados para 1C11 y 3A8 solamente.

10 La figura 12 muestra la alineación de los dos genes V_L obtenidos inicialmente. La figura 14A muestra la alineación de los cinco genes V_L secuenciados, mientras que los cinco genes V_L secuenciados de la figura 14B excepto el de 1C11.

15 El hecho de que un hibridoma (1C11) no produjo un producto de PCR con los cebadores iniciales que amplifican los genes V_H más comunes sugiere que utiliza un cuarto segmento de gen V_H no idéntico a ninguno de los otros identificados aquí. Dos de los hibridomas utilizaron el mismo gen de la línea germinal V_H, pero no son idénticos. Los hibridomas 2D11 y 3H6 utilizaron ambos el segmento génico V_H de la línea germinal J558.18.108. Sus secuencias se comparan con el gen de la línea germinal en la figura 11. La inspección de la secuencia revela que existe sólo una diferencia en CDR1, cuatro en CDR2 y cinco en CDR3 (incluyendo vacíos).

20 Los cinco hibridomas no son diferentes y entre ellos se utilizaron al menos cuatro genes de línea germinal V_H.

Ejemplo 10 - Inhibición de actividad enzimática de Gmd de *S. aureus* por los mAb 1C11, 2D11, 3H6, 1E12 y 3A8.

25 El método de medición de la actividad enzimática de Gmd es básicamente el método de Mani et al. (Mani et al., "Isolation and Characterization of Autolysis-Defective Mutants of *Staphylococcus aureus* Created by Tn917-lacZ Mutagenesis" J. Bacteriol. 175(5): 1493-1499 (1993)). Los *Micrococcus lysodeikticus* liofilizados y resuspendidos se degradaron por la acción de la Gmd, dando como resultado una reducción en la dispersión de la luz a 490 nm. Se añadieron 100 µl de muestra que contenía Gmd diluida en solución salina tamponada con fosfato con Tween 20 al 0,05 % (PBST) a los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se añadieron 100 µl de una suspensión al 0,15 % (p/v) de *Micrococcus lysodeikticus* a cada pocillo y se midió inmediatamente la dispersión de la luz para establecer el A₄₉₀ inicial, normalmente aproximadamente 0,8. Después, la placa se incubó a 37 °C y la dispersión de la luz se midió de nuevo en 30 y 60 minutos. La reducción en A₄₉₀ a 60 minutos se tomó como la medida de la actividad de Gmd. La modesta tasa de fondo (no Gmd) se restó. Este método no distingue la actividad de Gmd de la actividad de lisozima.

35 Para medir la inhibición de la actividad enzimática de Gmd, se pretituló la Gmd para determinar la concentración que producirá una reducción de aproximadamente un 50 % en A₄₉₀ en 60 minutos. Después, se añadieron 50 µl de anticuerpo diluido en PBST a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos seguido de 50 µl de Gmd diluida apropiadamente, y se dejó que las mezclas se incubaran durante 5 o más minutos, y finalmente se añadieron 100 µl de *Micrococcus lysodeikticus* al 0,15 % y se midió la A₄₉₀ inicial. Después, la placa se incubó a 37 °C y se midió el A₄₉₀ a los 30 y 60 minutos. El porcentaje de inhibición se calculó como 100*(1-(inhibidor Δ₆₀A₄₉₀/control sin inhibidor Δ₆₀A₄₉₀)).

40 En la figura 18, se evaluaron las diluciones en serie de cada uno de los cinco anticuerpos más el control negativo apareado a isotipo MOPC21 para determinar su capacidad de inhibir la actividad catalítica de His-Gmd (Gmd) de *S. aureus* recombinante o lisozima de huevo de gallina (HEL). Cada uno de los cinco anticuerpos monoclonales anti-Gmd inhibió la actividad His-Gmd en un 75-80 %, mientras que no mostró actividad inhibitoria con HEL. MOPC21 no tenía actividad inhibitoria con ninguna de las enzimas. El grado de inhibición de His-Gmd no se ha observado que supere el 80 % por estos cinco anticuerpos. La inhibición alta, aunque parcial, es una de las características de este grupo de anticuerpos.

45 La capacidad de los cinco anticuerpos para inhibir la enzima Gmd nativa secretada por la cepa de *S. aureus* UAMS-1 se representa en la figura 19. Como con la Gmd recombinante, la Gmd nativa se inhibió aproximadamente un 80 % por cada anticuerpo. Mediante la medida de la inhibición enzimática, los anticuerpos reaccionan de forma similar tanto con las Gmd nativas como con las recombinantes.

50 En las figuras 20C-D se muestra un análisis SEM de la actividad anti-Gmd para varios anticuerpos monoclonales. Xen29 *S. aureus* se cultivó durante 12 horas en caldo Luria-Bertani para conseguir una suspensión de crecimiento

de semi-logarítmica y después se incubaron con 10.000 UFC: (Figuras 20A-B) sin anticuerpo, (figura 20C) 50 µg/ml de 1E12, o (figura 20D) 50 µg/ml de 1C11 durante 1 hora. Después, las muestras se pusieron en placas de silicio estériles, se fijaron, se deshidrataron y se revistieron con oro para su visualización mediante microscopía electrónica de barrido. Las micrografías (figuras 20C-D) ilustran el efecto del anticuerpo anti-Gmd, promoviendo la formación de grandes grupos y la lisis independiente de células (flechas) de aproximadamente el 20 % de las células.

Ejemplo 11 - La vacuna pasiva que contiene mAb anti-Gmd inhibe *Staphylococcus aureus in vivo* tras el implante ortopédico en modelo OM de ratón

El modelo OM con clavo trans-tibial (véanse Ejemplos 1 y 6) se usó para evaluar la capacidad de los mAb candidatos 1C11 y 3A8 para inhibir el crecimiento de *S. aureus in vivo*. En resumen, ratones hembra de cinco semanas BALB/cJ recubrieron una inyección intraperitoneal de solución salina (n = 10) o 1 mg de anticuerpo anti-Gmd 3A8 purificado (n = 5) en 0,25 ml de solución salina o anticuerpo anti-Gmd A8 31C11 (n = 5) en 0,25 ml de solución salina 3 días antes de la cirugía. En la cirugía, los ratones recibieron un implante transtibial que contenía 500.000 UFC de Xen29 *S. aureus*. Los ratones se diagnosticaron por imagen para evaluar la bioluminiscencia los días 0, 3, 5, 7, 10 u 11, y 14, y las imágenes con el mapa de calor de BLI de un animal representativo en cada grupo se muestran en las figuras 21A y 22A. Destaca la ausencia de una señal de BLI en el animal 3A8 anti-Gmd hasta el día 11 y el animal 1C11 hasta el día 5, presumiblemente cuando la valoración de anticuerpo disminuyó por debajo de la concentración eficaz. Los valores de BLI el día 3 para cada ratón en el estudio se muestran con la media para cada grupo (figura 21B, p = 0,02; figura 22B). Para 1C11, resulta interesante apreciar que esta terapia curó al 50 % de los animales el día 3. Los rayos X de un animal representativo en cada grupo obtenido el día 14 se muestran para ilustrar la lesión osteolítica (flecha) en el ratón de placebo, que no estaba presente en los animales tratados con anti-Gmd (figuras 21C, 22C).

Ejemplo 12 - Generación de anticuerpo humanizado

Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 1C11 se reamplificaron a partir del producto de PCR de hibridoma purificado descrito en el ejemplo 9 usando cebadores para permitir la clonación en los vectores de expresión de anticuerpo humano descritos por Tiller et al. ("Efficient Generation of Monoclonal Antibodies from Single Human B Cells by Single Cell RT-PCR and Expression Vector Cloning", J. Immunol. Methods 329(1-2): 112-24 (2008)). Los plásmidos que contenían las regiones variables de la cadena ligera y pesada 1C11 y las regiones constantes kappa e IgG1 humanas se prepararon y se co-transfectaron en células HEK293. Después de 3 días, se retiró el medio de las células y se ensayó para determinar la presencia de IgG humana y para la unión a la proteína Gmd inmovilizada mediante ELISA. El anticuerpo unido se detectó usando un anticuerpo de IgG anti-Humano de cabra acoplado a peroxidasa de rábano picante y sustrato de 3,3', 5, 5' tetrametilbenzideno.

Para establecer que el 1C11 humano:ratón quimérico (h1C11) reaccionó con Gmd, así como el ratón parental 1C11, cada uno se ensayó para determinar su capacidad para inhibir la actividad enzimática de His-Gmd. Tanto h1C11 como 1C11 de ratón mostraron una actividad inhibidora casi idéntica (figura 23), demostrando así que la molécula de IgG quimérica retuvo la actividad de unión del precursor.

Se realizará un procedimiento similar usando los homólogos CDR1 y CDR2 humanos de 1C11 identificados en las figuras 17A-B, y una región CDR3 de una o más regiones D candidatas incluyendo, sin limitación, IGHD5-5, 18, y 12*01.

El anticuerpo 1C11 humanizado y el anticuerpo que comprende los homólogos CDR1 y CDR2 humanos de 1C11 pueden utilizarse en un ensayo clínico de fase I en pacientes ancianos (>65 años) sometidos a un reemplazo de articulación total primario.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a una glucosaminidasa de *Staphylococcus aureus* e inhibe el crecimiento *in vivo* de *S. aureus*, en donde el anticuerpo o la porción de unión a antígeno se unen a un epítipo completa o parcialmente dentro del dominio R3 de glucosaminidasa de *Staphylococcus aureus*.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal o la porción de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el *S. aureus* es resistente a la meticilina.
- 15 3. El anticuerpo monoclonal o la porción de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o la porción de unión a antígeno comprenden los dominios V_H y V_L seleccionados entre los siguientes pares de secuencias aminoacídicas:
 - (i) QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTYGMSWVNQAPGKGLKW MGWINTYSGVPTYADDFK-GRFVFSLETSASTAYLQINNLIKNETATYF CAREEYSSGYAAWFPYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 5), y DIVLTQSPATLSVTPGDSVLSRCRASQISNNLHWYQQKSHESPRLLIEY ASRSISGIPSRFSGGGSGTDFTLINSVESEDFGLYFCQQSNSWPLTFGA GTKLELK (SEQ ID NO: 12); o
 - 20 (ii) EVQLQESGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDYMNWVKQSHGKSLE WIGVINPYNGDTTYSQKFKG-KATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVY YCARNYDEYFDVWGTGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPG-SAAQTNSMVT LGCXVKG (SEQ ID NO: 1) donde X es cualquier aminoácido, y DIVMTQSPAIMSASPGEKVTMTC-SASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIY DTSNLAGSVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSY-PLT FG (SEQ ID NO: 8); o
 - 25 (iii) EVQLQESGPVLVKPGASVKLSCKASGYTFTDYFMNWKQSHGKSLE WIGVINPFNGGNRYNQNFKG-KATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAV YYCARGDYDSPWFDYWGQGLTVTVSAAKTTTPPSVYPLAPG-SAAQTN SMVTLGCLVKGYXSXQ (SEQ ID NO: 2), donde X es cualquier aminoácido y QMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYY TSSLHSGVPSRFSGGSGTDYS-LSISNLEPEDIATYYCQQYSKLPWTFG GGTKLEIK (SEQ ID NO: 9); o
 - 30 (iv) EVQLQESGGGFVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYVMSWVRQTPEKRLEW VATISDGGGHYYLDNVK-GRFTISRDNKNNLYLHMSHLKSEDTAMY YCARAYYGSSYDAMDYWGQGSVTVSSAKTTPPSVYPLAPG SAAQT NSMVTLGCLVKG (SEQ ID NO: 3), y DIVITQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSYLHWYQQKPGSSPKXWI YSTSNLAGSVPARFSGSGSGT-SYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPW TFGGGT (SEQ ID NO: 10), donde X es cualquier aminoácido; o
 - 35 (v) EVQLQESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLE WVAEIKDKTNNHATYYAESVK-GRFTISRVDVSKSRVFLQMNSLRPEDT GIYYCTSGPYFDYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNS-MVT LGCLVKGYFPE (SEQ ID NO: 4), y DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLI YWTSTRHTGVPDRFTGSGS-GTDFTLTISSVQAKDLALYYCQQHYTTPY TFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 11).
- 40 4. El anticuerpo monoclonal o la porción de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal o la porción de unión a antígeno promueve lisis independiente de las células de *S. aureus*.
- 45 5. El anticuerpo monoclonal o la porción de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal o la porción de unión a antígeno inhibe la actividad de Gmd en aproximadamente el 70 a aproximadamente el 80 %.
- 50 6. El anticuerpo monoclonal o la porción de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo monoclonal está humanizado.
- 55 7. El anticuerpo monoclonal o la porción de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la porción de unión a antígeno comprende un fragmento Fab, un fragmento Fv, un anticuerpo monocatenario, un dominio V_H o un dominio V_L.
- 60 8. Una línea celular que expresa un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una porción de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, opcionalmente en donde la línea celular es un hibridoma.
- 65 9. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo y uno o más anticuerpos monoclonales de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una o más porciones de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; opcionalmente en donde el vehículo es una solución acuosa.
10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 que comprende adicionalmente un agente antibiótico o un agente inmunoterapéutico, opcionalmente en la que el agente antibiótico se selecciona entre el grupo que consiste en vancomicina, tobramicina, cefazolina, eritromicina, clindamicina, rifampina, gentamicina, ácido fusídico, minociclina, co-trimoxazol, clindamicina, linezolida, quinupristina-dalfopristina, daptomicina, tigeciclina, dalbavancina, telavancina, oritavancina,

ceftobiprol, ceftarolina, iclaprim y el carbapenem CS-023/RO-4908463, y opcionalmente en la que el agente inmunoterapéutico es tefibazumab.

- 5 11. Una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, una porción de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía en donde la cirugía comprende introducir un implante ortopédico en un paciente que necesita un implante ortopédico y en donde el implante ortopédico está revestido o tratado con el anticuerpo monoclonal, la porción de unión a antígeno o la composición farmacéutica, antes, durante o inmediatamente después del implante.
- 10
- 15 12. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, una porción de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía en donde la cirugía comprende introducir un implante ortopédico en un paciente que necesita un implante ortopédico y en donde el implante ortopédico está revestido o tratado con el anticuerpo monoclonal, la porción de unión a antígeno o la composición farmacéutica, antes, durante o inmediatamente después del implante.
- 20 13. El anticuerpo monoclonal, la porción de unión a antígeno o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, o el uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la administración del anticuerpo monoclonal, la porción de unión a antígeno o la composición farmacéutica se repite antes de o después de introducir el implante ortopédico; o en donde dicha administración se realiza sistemáticamente.
- 25 14. El anticuerpo monoclonal, la porción de unión a antígeno o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 13, o el uso de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde el anticuerpo monoclonal, la porción de unión a antígeno o la composición farmacéutica se administran directamente a un sitio de implante.
- 30 15. El anticuerpo monoclonal, la porción de unión a antígeno o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, o el uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el implante ortopédico es una prótesis articular, un injerto o un implante sintético, opcionalmente en donde la prótesis articular es una prótesis de rodilla, una prótesis de cadera, una prótesis de dedo, una prótesis de codo, una prótesis de hombro, una prótesis temperomandibular o una prótesis de tobillo,
- 35 opcionalmente en donde el injerto o el implante sintético son un disco intervertebral artificial, un implante de menisco, o un ligamento cruzado anterior sintético o de aloinjerto, un ligamento colateral tibial, un ligamento colateral lateral, un ligamento cruzado posterior, un tendón de Aquiles o un manguito rotador.
- 40 16. El anticuerpo monoclonal, la porción de unión a antígeno o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, o el uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el implante ortopédico es una prótesis articular para una revisión de reemplazo de articulación total, y en donde una prótesis articular infectada se extrae del paciente y se trata el paciente para la infección antes de introducir dicho implante ortopédico en el paciente, opcionalmente en donde dicho tratamiento comprende administrar una cantidad eficaz de un agente antibiótico, un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, una porción de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 o una combinación de los mismos, y opcionalmente en donde dicho uso es eficaz para impedir la infección o la reinfección durante la revisión de un reemplazo de articulación total.
- 50 17. Una cantidad eficaz de anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, una porción de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 para su uso en el tratamiento de una infección por *S. aureus* en un paciente que tiene una infección por *S. aureus*.
- 55 18. Una cantidad eficaz de anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, una porción de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 para su uso en el tratamiento de la osteomielitis en un paciente que tiene una infección ósea o articular por *S. aureus*.
- 60 19. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, una porción de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección por *S. aureus* en un paciente que tiene una infección por *S. aureus*.
- 65

20. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, una porción de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de osteomielitis en un paciente que tiene una infección ósea o articular por *S. aureus*.

5
10
15
21. El anticuerpo monoclonal, la porción de unión a antígeno o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11, 17 o 18, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12, 19 o 20, en donde un segundo agente terapéutico se administra al paciente, y en donde el segundo agente terapéutico es un agente antibiótico o un agente inmunoterapéutico, opcionalmente en donde el agente antibiótico se selecciona entre el grupo que consiste en vancomicina, tobramicina, cefazolina, eritromicina, clindamicina, rifampina, gentamicina, ácido fusídico, minociclina, co-trimoxazol, clindamicina, linezolida, quinupristina-dalfopristina, daptomicina, tigeciclina, dalbavancina, telavancina, oritavancina, ceftobiprol, ceftarolina, iclaprim y el carbapenem CS-023/RO-4908463, opcionalmente en donde el agente inmunoterapéutico es tefibazumab.

20
22. El anticuerpo monoclonal, la porción de unión a antígeno o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 13 a 18, o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16 o 19 a 21, en donde el paciente es mayor de 50 años o está inmunodeprimido.

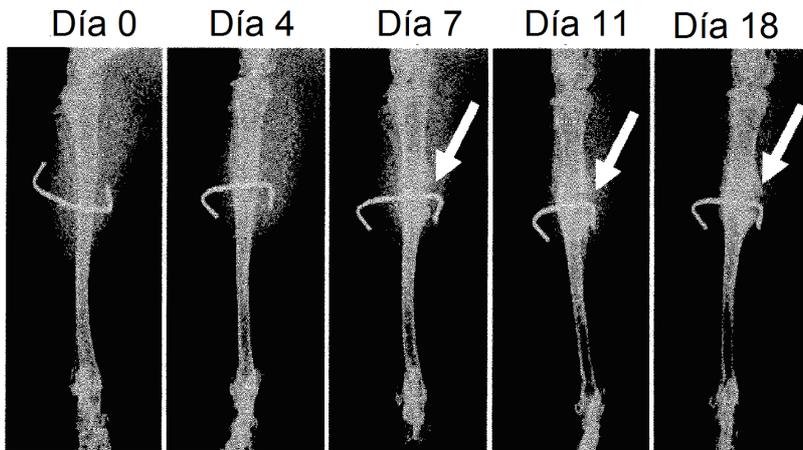


FIG. 1A

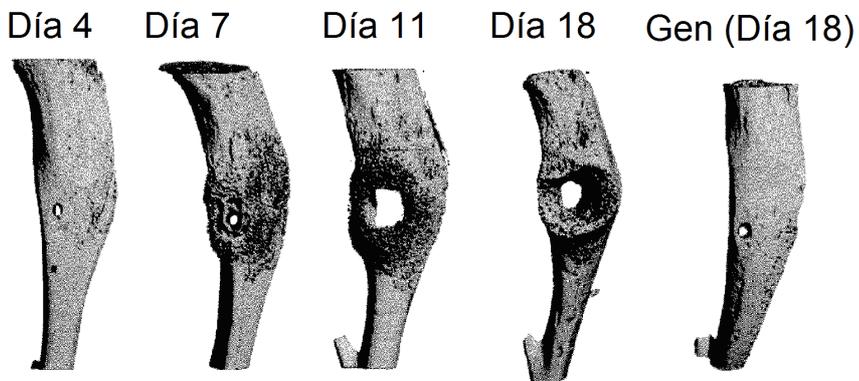


FIG. 1B

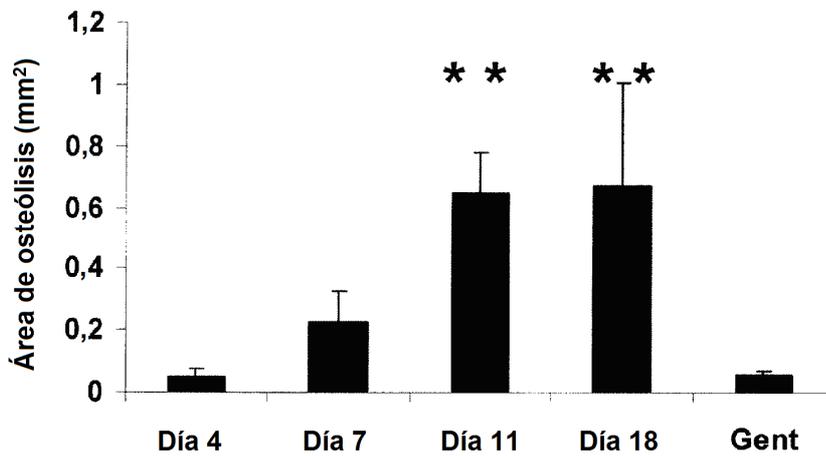
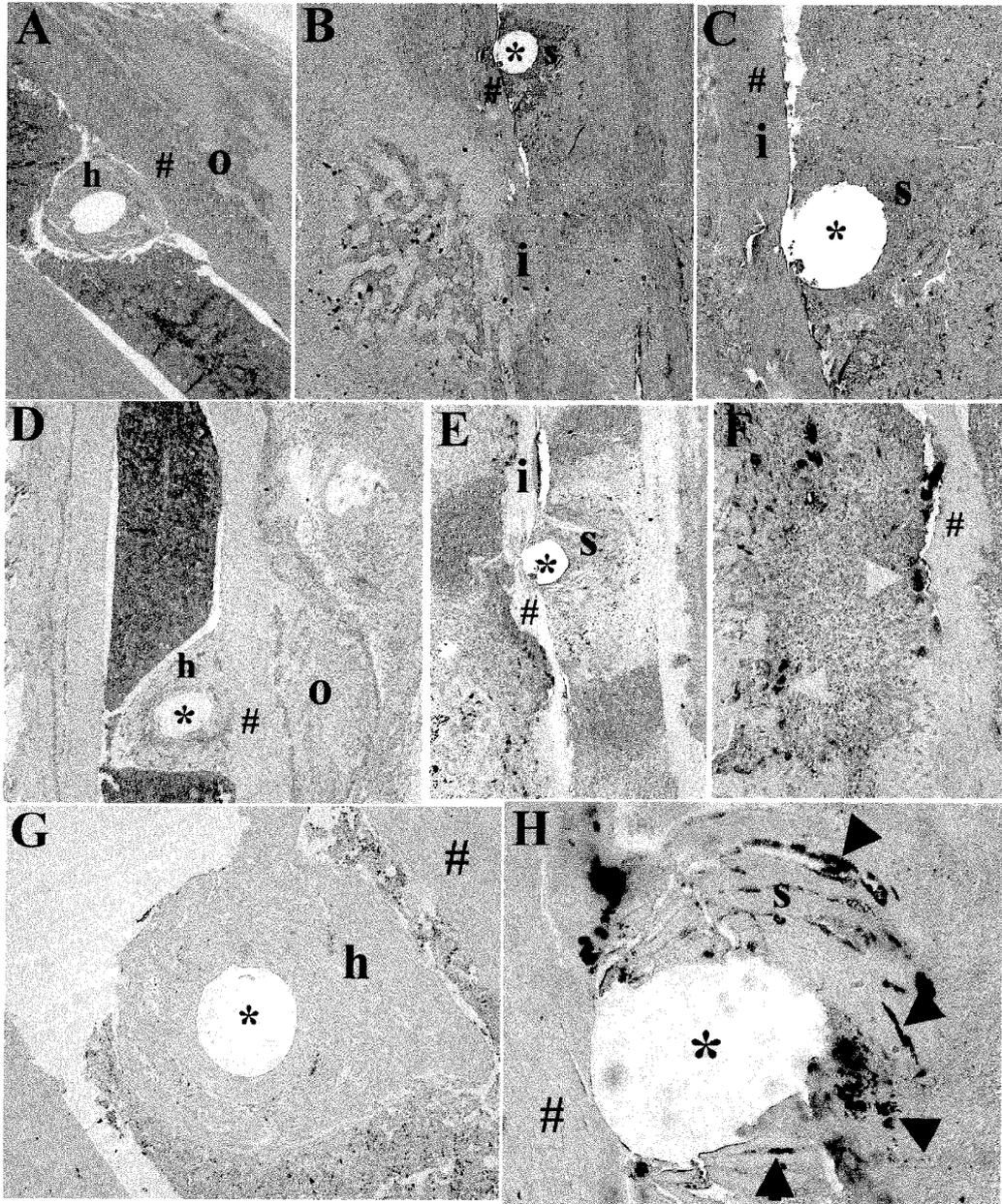


FIG. 1C



FIGS. 2A-H

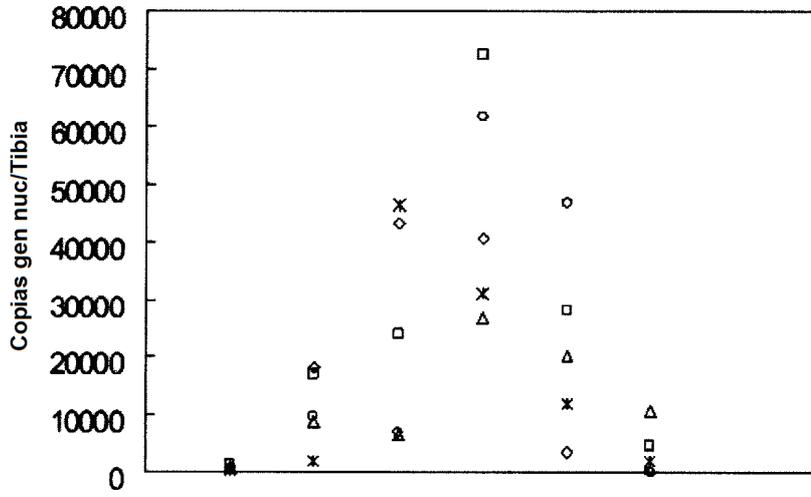


FIG. 3A

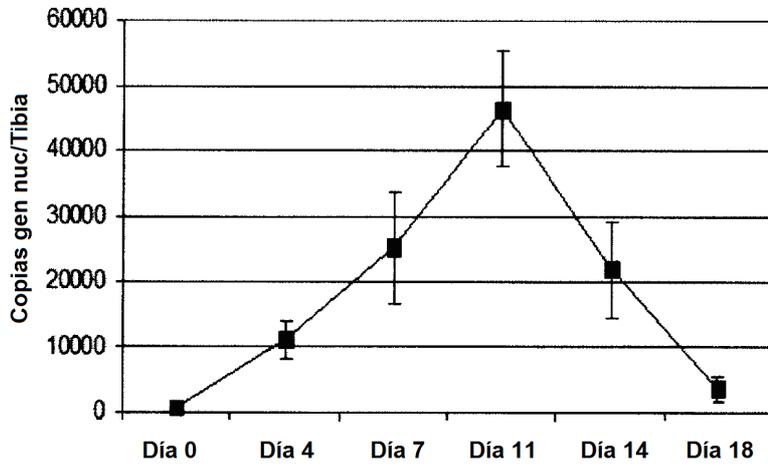


FIG. 3B

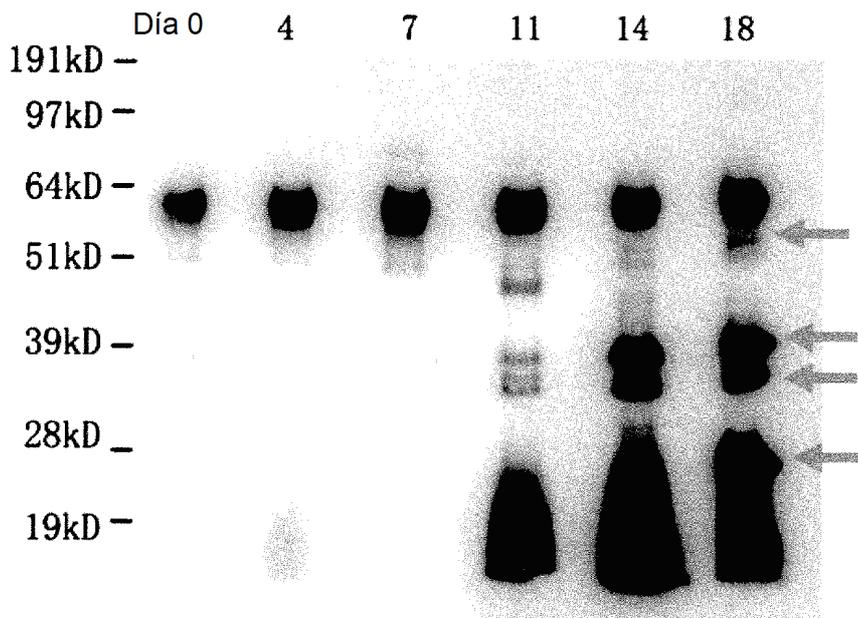


FIG. 3C

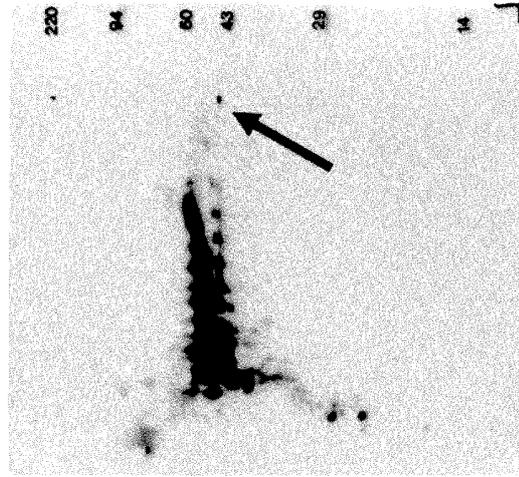


FIG. 4C

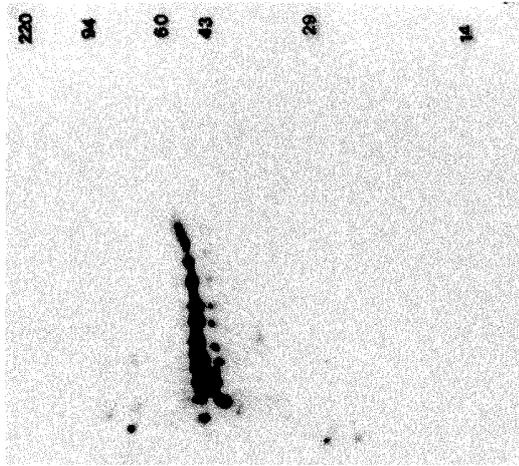


FIG. 4B

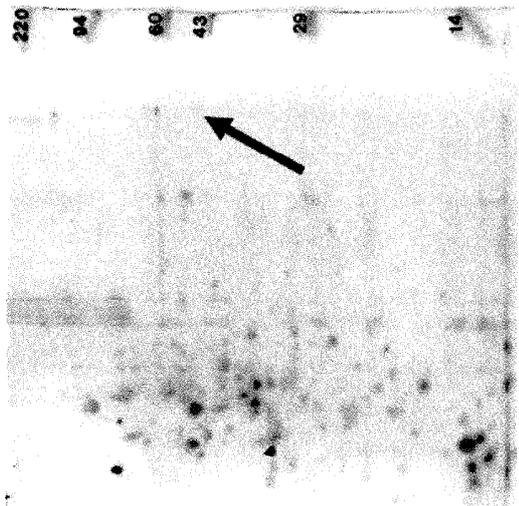


FIG. 4A

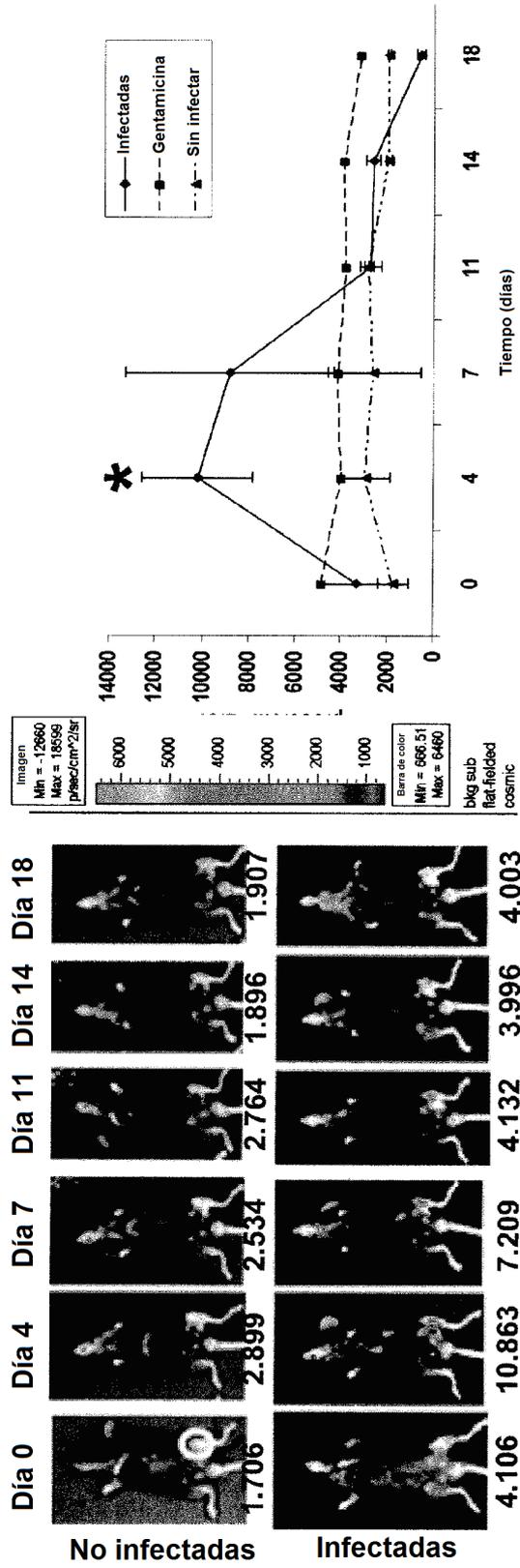


FIG. 5A

FIG. 5B

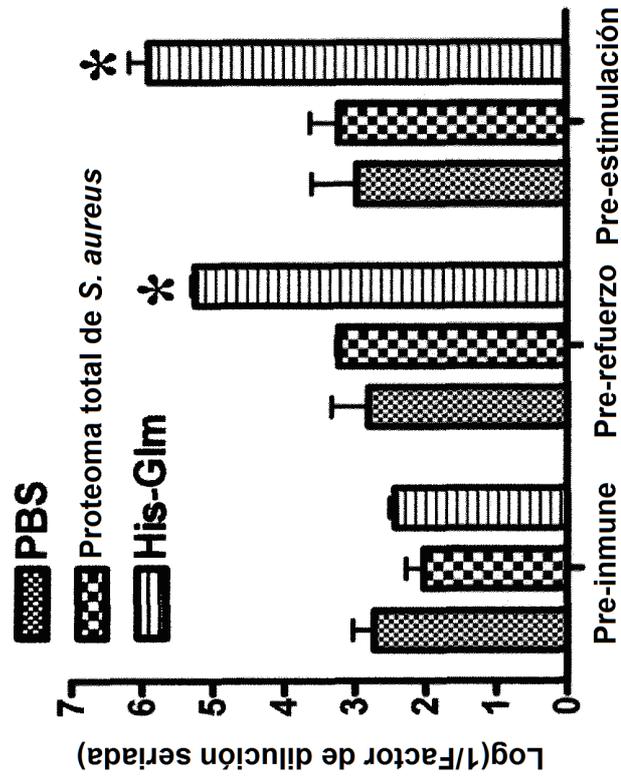


FIG. 6B

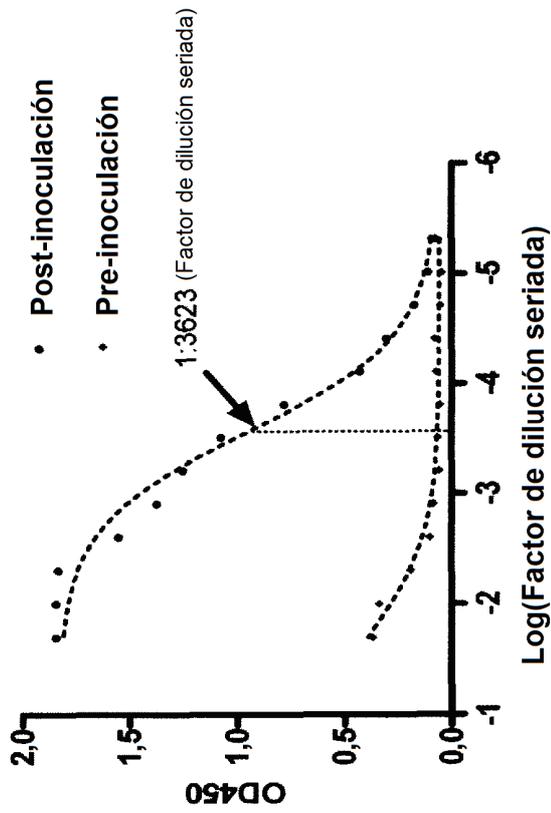


FIG. 6A

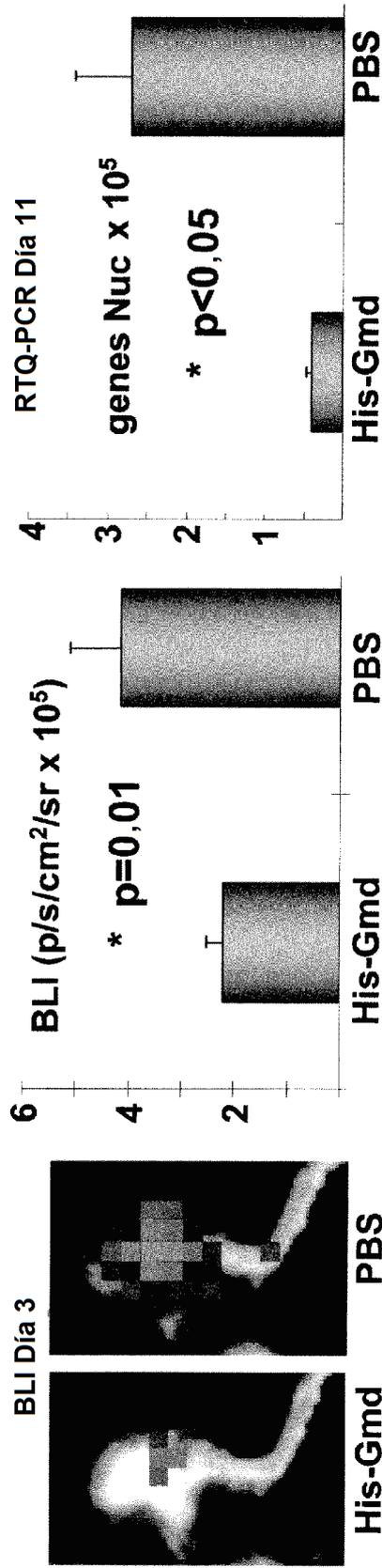


FIG. 7A

FIG. 7B

FIG. 7C

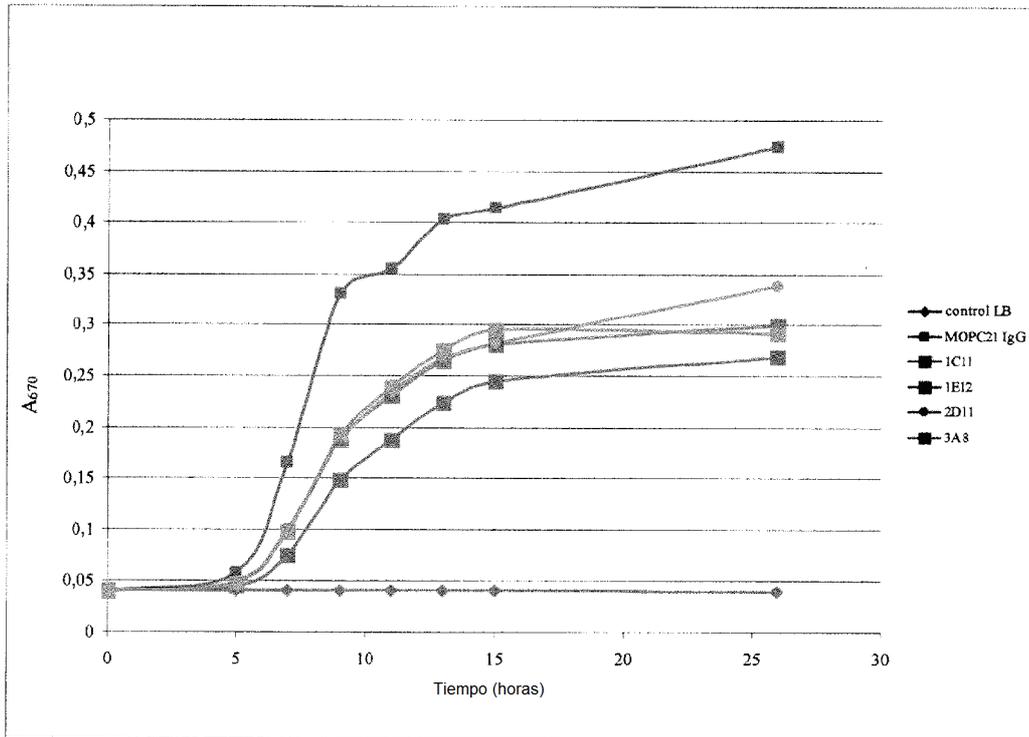


FIG. 8

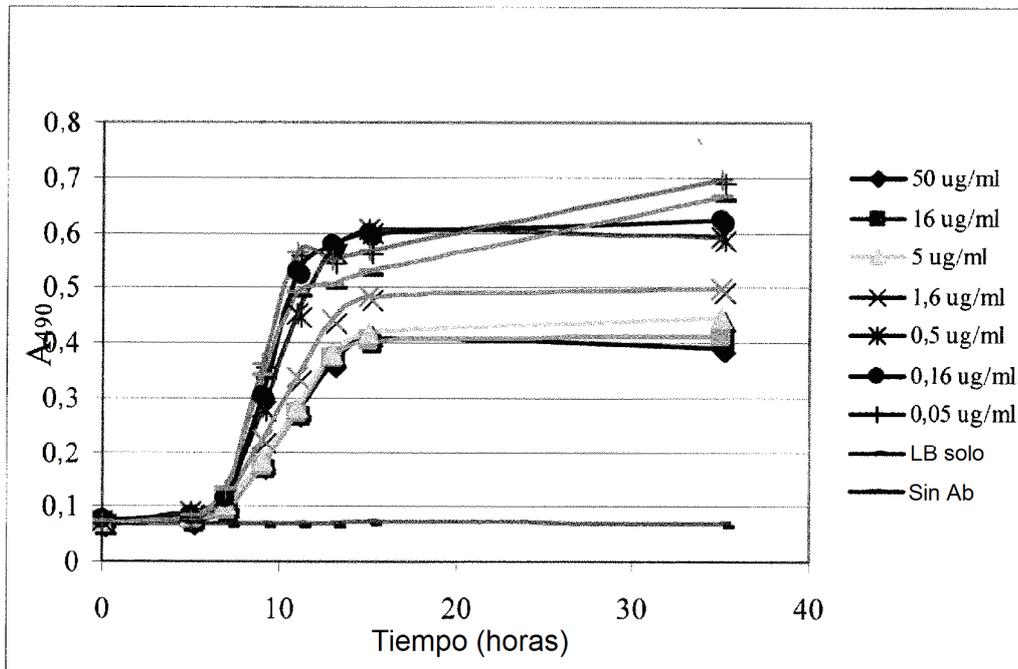


FIG. 9

Alineamiento clustal de segmentos V_L

```

1E12 (SEQ ID NO: 10)
2D11 (SEQ ID NO: 8)
Consenso (SEQ ID NO: 32)

1E12          DIVITQSPAIMASALGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKXWIYSTSNLASGVP 60
2D11          DIVMTQSPAIMASAPGKVTMTCSASSSVS--YMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAGSVP 58
                ***:***** **:*:*:*:*:*:* *:*:*:*:*:*: **:******
Consenso      DIVXTQSPAIMASXGEXVTMTXCASSSVSXXYXXWYQQKPGSSPXXIXYXTSNLAGSVP

1E12          ARFSGSGSGTYSYSLTISMEAEADAATYCHQYHRSPWTFGGGT 103
2D11          VRFSGSGSGTYSYSLTISRMEAEADAATYCCQWSSYPLTFG--- 98
                .***** **:*:*:*:*:*:* *:*:*:*:*:*: * * *
Consenso      XRFSGSGSGTYSYSLTISXMEAEADAATYCXQXXXXPXTFGXXX
    
```

donde "X" es cualquier residuo aminoacídico o una deleción de residuo aminoacídico.

FIG. 12

Alineamiento clustal de todos los segmentos V_H

```

2D11_VH (SEQ ID NO: 1)
3H6_VH (SEQ ID NO: 2)
1E12_VH (SEQ ID NO: 3)
3A8_VH (SEQ ID NO: 4)
1C11_VH (SEQ ID NO: 5)
Consenso (SEQ ID NO: 6)

1E12_VH      EVQLQESGGGFVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYVMSWVRQTPEKRLWVATISDGGG--HT 58
3A8_VH      EVQLQESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIKDKTNNHAT 60
2D11_VH      EVQLQESGFVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDYMNWVKQSHGKSLEWIGVINPYNG--DT 58
3H6_VH      EVQLQESGFVLVKPGASVKLSCKASGYTFTDYFMNWVKQSHGKSLEWIGVINPFNG--GN 58
1C11_VH      QIQLVQSGFELKKPGETVKISCKASGYTFTTYGMSWVNQAPGKGLKWMGWINTYSG--VP 58
                ::** :** : :** ::*:* **:*:*: *.*.*: * *:*:* . * .
Consenso      XXQLXXSGXXXXXPGXXXXXSCXASGXTFXXXMXWVXQXXXXLXWXXXIXXXXXXXXXX

1E12_VH      YYLDNVKGRFTISRDNKNNLYLHMSHLKSEDTAMYICARAYYGS-SYDAMYWGQGTSV 117
3A8_VH      YYAESVKGRFTISRDKSRVFLQMNSLRPEDTGIYYCTSGPY-----FDYWGQGTTL 113
2D11_VH      TYSQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCAR-NYD---EYFDVWGQGTTV 113
3H6_VH      RYNQNFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARGDYDS---PWFDYWGQGTLV 115
1C11_VH      TYADDFKGRFVFSLETSASTAYLQINLNKNETATYFCAREEYSSGYAAWFPYWGQGTLV 118
                * ..**: .: : : . : : . * **;. *:*: * : ** ** ;
Consenso      YXXXXXRGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXLXXEDXXXVXCXXXXYXXXXXXXXXXXXWGXTXX

1E12_VH      TVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKG----- 152
3A8_VH      TVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPE- 152
2D11_VH      TVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCVKG----- 148
3H6_VH      TVSAAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKCYSXSQ 155
1C11_VH      TVSA----- 122
                ***;
Consenso      TVSXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
    
```

donde "X" es cualquier residuo aminoacídico o una deleción de residuo aminoacídico.

FIG. 13

Alineamiento clustal de todos los segmentos VL

```

1E12 (SEQ ID NO: 10)
2D11 (SEQ ID NO: 8)
3A8 (SEQ ID NO: 11)
3H6 (SEQ ID NO: 9)
1C11 (SEQ ID NO: 12)
Consenso (SEQ ID NO: 13)

1E12_VL      DIVITQSPAIMASASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKXWIYSTSNLASGVP 60
2D11_VL      DIVMTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVS--YMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVP 58
3A8_VL       DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQDVS-TAVAWYQQKPGQSPKLLIYWTSTRHTGVP 59
3H6_VL       --QMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGIS-NYLNWYQQKPDGTVKLLIYTTSSLHSGVP 57
1C11_VL      DIVLTQSPATLSVTPGDSVLSRCSASQGIS-NNLHWYQQKSHESPRLLIYASRSISGIP 59
** : ** :   : * : * : : * * * : *   : * * * * .   : : *   : *   : * : *
Consenso     DIXXTQXXXXXSSXXGXVXXXCXASXXSXXXXXWYQQKXXXXXXXXXIXXSXXXXGX

1E12_VL      ARFSGSGSGTYSYSLTISMEAEADAATYCHQYHRSPWTFGGGT----- 104
2D11_VL      VRFSGSGSGTYSYSLTISRMEAEADAATYCCQWSSYPLTFG----- 98
3A8_VL       DRFTGSGSGTDFTLTISVQAKDLALYCCQHYTTPYTFGGGTKLEIK 107
3H6_VL       SRFSGGGSGTDYSLSISNLEPEDIATYCCQYKLPWTFGGGTKLEIK 105
1C11_VL      SRFSGGGSGTDFTLINSVESEDFGLYFCQNSWPLTFGAGTKLEIK 107
* * : * . * * * * . : : * : * . : : * * * * *   * * * * *
Consenso     XRFXGXGSGTXXXXLXIXXXXXDXXXYXCXQXXXXPXTFGXGTXXXXX
    
```

donde "X" es cualquier residuo aminoacídico o una deleción de residuo aminoacídico.

FIG. 14A

Alineamiento clustal de cuatro segmentos VL

```

1E12 (SEQ ID NO: 10)
2D11 (SEQ ID NO: 8)
3A8 (SEQ ID NO: 11)
3H6 (SEQ ID NO: 9)
Consenso (SEQ ID NO: 33)

1E12_VL      DIVITQSPAIMASASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKXWIYSTSNLASGVP 60
2D11_VL      DIVMTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVS--YMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVP 58
3H6_VL       --QMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGIS-NYLNWYQQKPDGTVKLLIYTTSSLHSGVP 57
3A8_VL       DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQDVS-TAVAWYQQKPGQSPKLLIYWTSTRHTGVP 59
** : ** :   : * : * : : * * * : *   : * * * * .   : : *   : *   : * : *
Consenso     DIXXTQXXXXXSSXSXSXXXXXSXSXXXXXWYQQKXXXXXXXXIXYTSXXXXGVP

1E12_VL      PARFSGSGSGTYSYSLTISMEAEADAATYCHQYHRSPWTFGGGT----- 104
2D11_VL      PVRFSGSGSGTYSYSLTISRMEAEADAATYCCQWSSYPLTFG----- 98
3H6_VL       PSRFSGGGSGTDYSLSISNLEPEDIATYCCQYKLPWTFGGGTKLEIK 105
3A8_VL       PDRFTGSGSGTDFTLTISVQAKDLALYCCQHYTTPYTFGGGTKLEIK 107
* * : * . * * * * . : : * : * . : : * * * * *   * * * * *
Consenso     PXRFXGXGSGTXXXXLXISXXXXDXAXYYXCXQXXXXPXTFGGGTXXXXX
    
```

FIG. 14B

Alineamiento clustal de segmentos V_H 1C11 y 3A8

```

3A8 (SEQ ID NO: 4)
1C11 (SEQ ID NO: 5)
Consenso (SEQ ID NO: 7)

1C11_VH      QIQLVQSGPELKKPGETVKI.SCKASGYTFTTYGMSWVNQAPGKGLKWMGWIN--TYSGVP 58
3A8_VH      EVQLQESGGGLVQPGGSMKLSCAASGPTFSDAWMDWVRQSPKGLKLEWVAEIKDKTNNHAT 60
Consenso    ::* :* * :* :*:** ***:** : *.*.*.* ***:*. * : * . . .
            XXQLXXSGXXLXXPGXXXKXSCXASGTFXXXXMXWVXQXPXKGLXWXXXIXXXTXXXXX

1C11_VH      TYADDFKGRFVFSLETSASTAYLQINNLNKEDTATYFCAREEYSSGYAAWFPYWGQGLV 118
3A8_VH      YYAESVKGRFTISRDVSKSRVFLQMNSLRPEDTGIYYCT-----SG--PYFDYWGQGLT 113
Consenso    **:..**.*.* :* :.* * .:***:*.*: ***. *:*: ** .:* ***:** :
            XYAXXXKGRFXSXXXSXSXXLQXNLXXEDTXXYXCXXXXXXSGXXXXFXWYWGQGTXX

1C11_VH      TVSA----- 122
3A8_VH      TVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNMVTLGCLVKGYFPE 152
Consenso    ***:
            TVSXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
    
```

donde "X" es cualquier residuo aminoacídico o una deleción de residuo aminoacídico.

FIG. 15

Alineamiento clustal de segmenos V_L 1C11 y 3A8

```

3A8 (SEQ ID NO: 11)
1C11 (SEQ ID NO: 12)
Consenso (SEQ ID NO: 14)

1C11_VL      DIVLTQSPATLSVTPGDSVLSLSCRASQSSISNNLHWYQQKSHESPRLLIEYASRSISGIPS 60
3A8_VL      DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWTSTRHTGVPD 60
Consenso    ***:** * :. : * ***:**:*.*. : ***. :**:* ** :* :*.*.
            DIVXTQXXXXXXXGXDXVXXXCASQXXXXXXWYQQXXXSPXLLIXXXSXXXGXPX

1C11_VL      RFSGGSGTDFTLINSVESEDFGLYFCQQNSWPLTFGAGTKLELK 107
3A8_VL      RFTGSGSGTDFTLTISSVQAKDLALYYCQHYTTPYTFGGGTKLEIK 107
Consenso    **:*.*****:*.*.:*:*.*.* ** : * ***.*****:*
            RFXGXSGTDFTLXIXSVXXXDXXLYXCQXXXXXPXTFGXGTKLEKX
    
```

donde "X" es cualquier residuo aminoacídico o una deleción de residuo aminoacídico.

FIG. 16

ES 2 606 017 T3

CDR1

1C11 H QIQLVQSGPELKKPGETVKLSCKASGYTFT TYGMS WVNQAPGKGLKWMG
7-81GL QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSCASGYSFT TYGMN WVPQAPGQGLEWMG
Consenso QXQLVQSGEXEXKXPGXXVKXSCASGYXFT TYGMX WVXQAPGXGLXWMG

CDR2

1C11 H WINTYSGVPTYADDFKG RFVFSLETSASTAYLQINNLIKNDTATYFCAR
7-81GL WFNTYTGNTPTYAQGFTG RFVFSMDTSASTAYLQISSLKAEDMAMYICAR
Consenso WXNTYXGXPTYAXXFXG RFVFSXXTSASTAYLQIXXLKXEDXAXYICAR

CDR3

1C11 H EEYSSGYAAWFP YWQGTLVTVSA
7-81GL YWQGTLVTVSA
Consenso XXXXXXXXXXXXX YWQGTLVTVSA

HJ4

FIG. 17A

1C11 L DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSC RASQSISN NLHWYQQKSHESPRLLIE
VK6D-21 EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC RASQSIGS SLHWYQQKPDQSPKLLIK
Consenso XIVLTQSPXXXSVTPXXXVXXXC RASQSIXX XLHWYQQXXXSPXLLIX

1C11 L YASRSIS GIPSRFSGGSGTDFTLINSVESEDFGLYFC
VK6D-21 YASQSFS GVPSRFSGSGTDFTLINSLEAEDAATYYC
Consenso YASXSXS GXPSRFSGXGSGTDFTLXINSXEXEDXXXYYC

1C11 L QQSNSWP LTFGAGTKLELK
VK6D-21 HQSSSLP LTFGGGTKVEIK
Consenso XQSXSXP LTFGXGTXKXEXK

KJ4

FIG. 17B

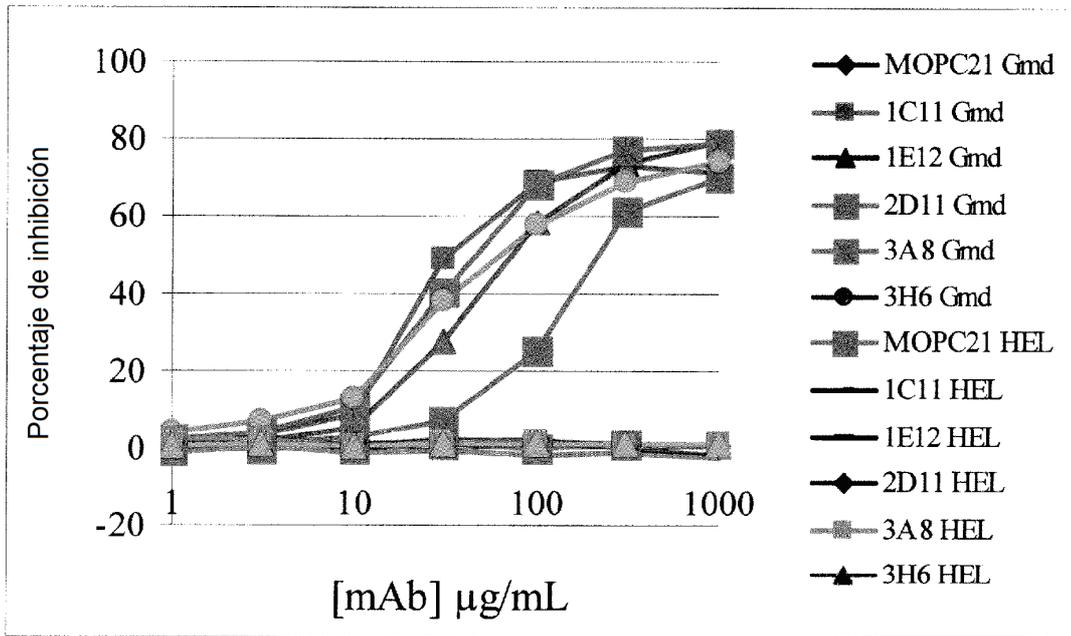


FIG. 18

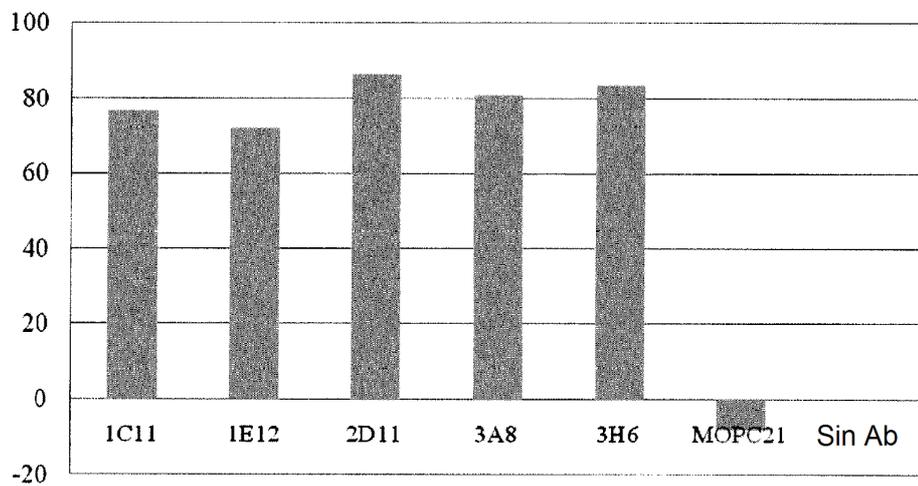


FIG. 19

FIG. 20A

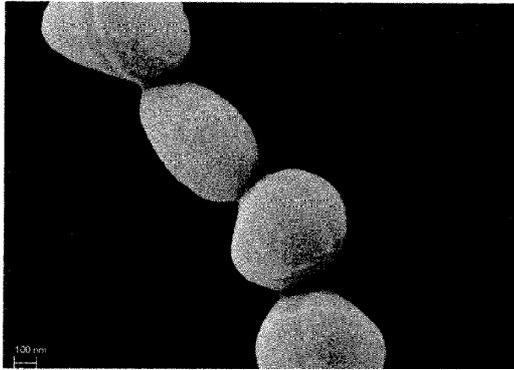


FIG. 20C

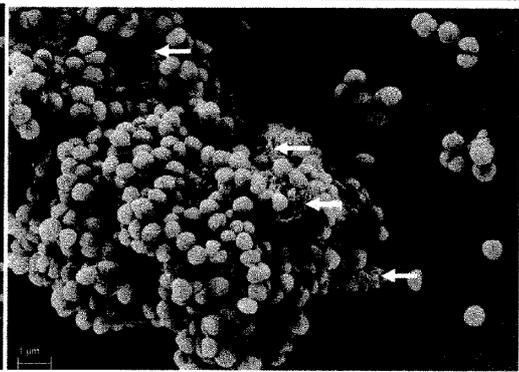
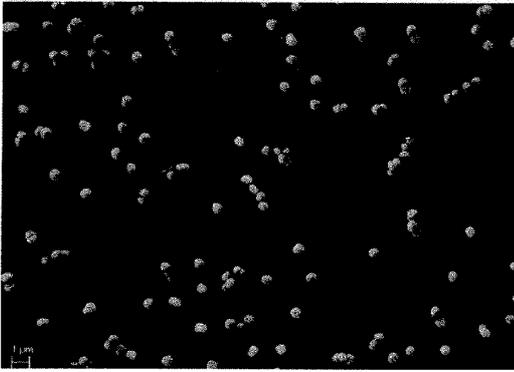
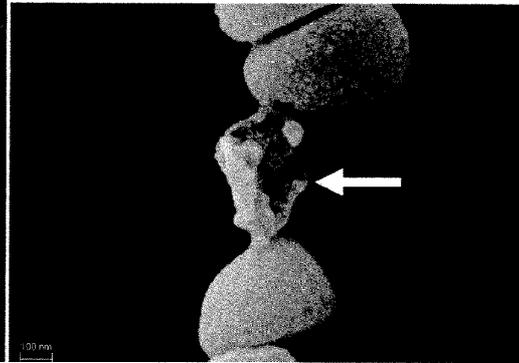


FIG. 20B

FIG. 20D

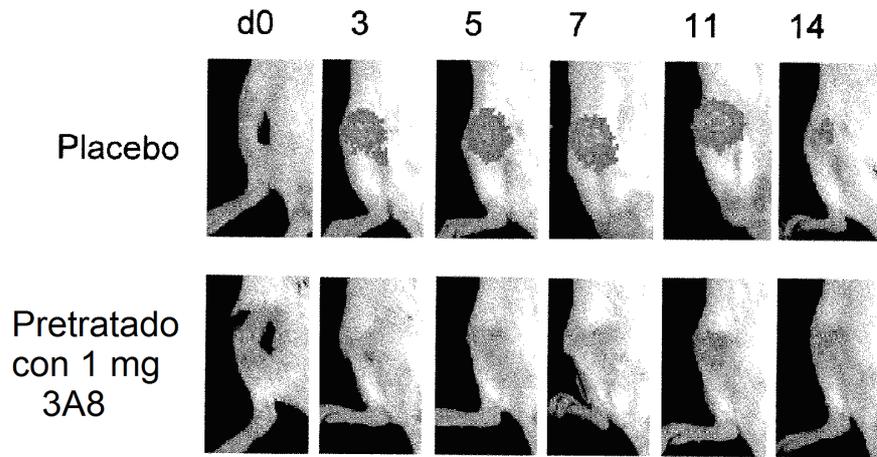


FIG. 21A

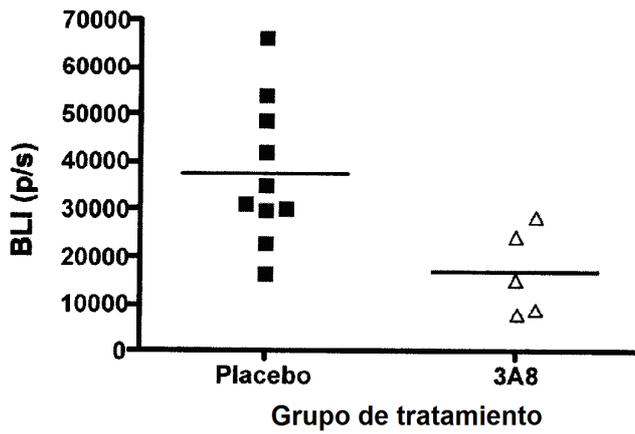


FIG. 21B

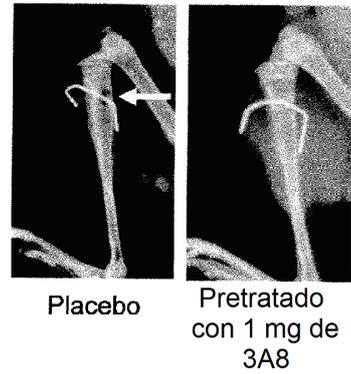


FIG. 21C

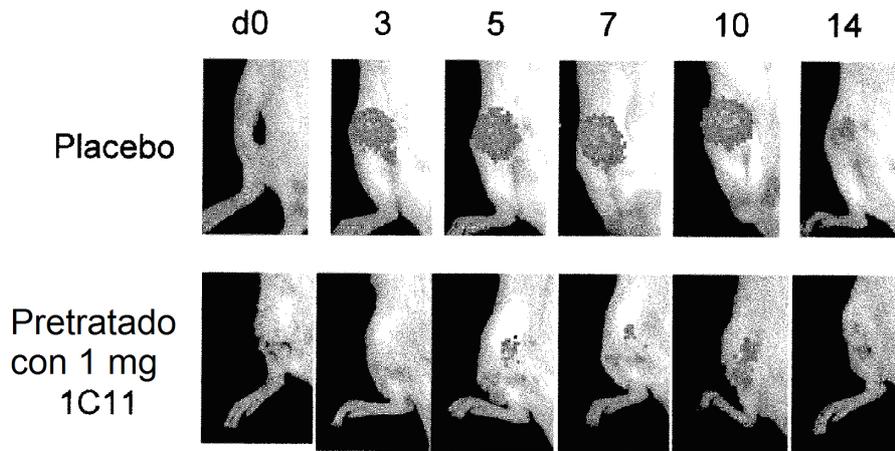


FIG. 22A

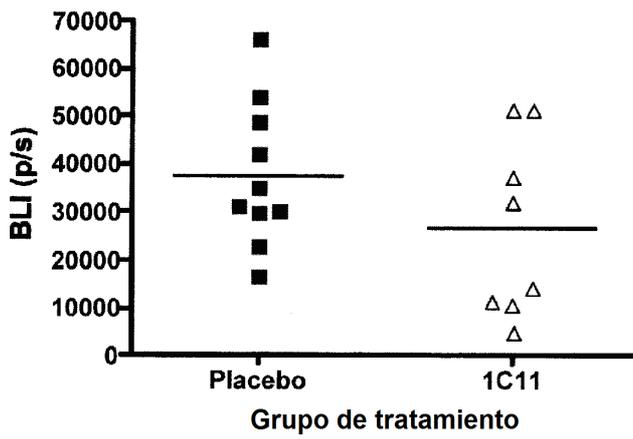


FIG. 22B

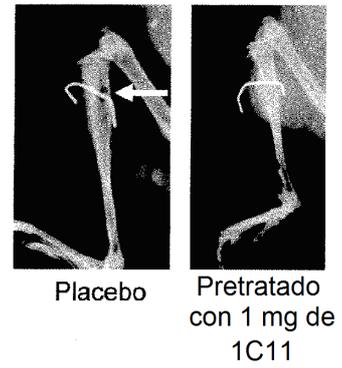


FIG. 22C

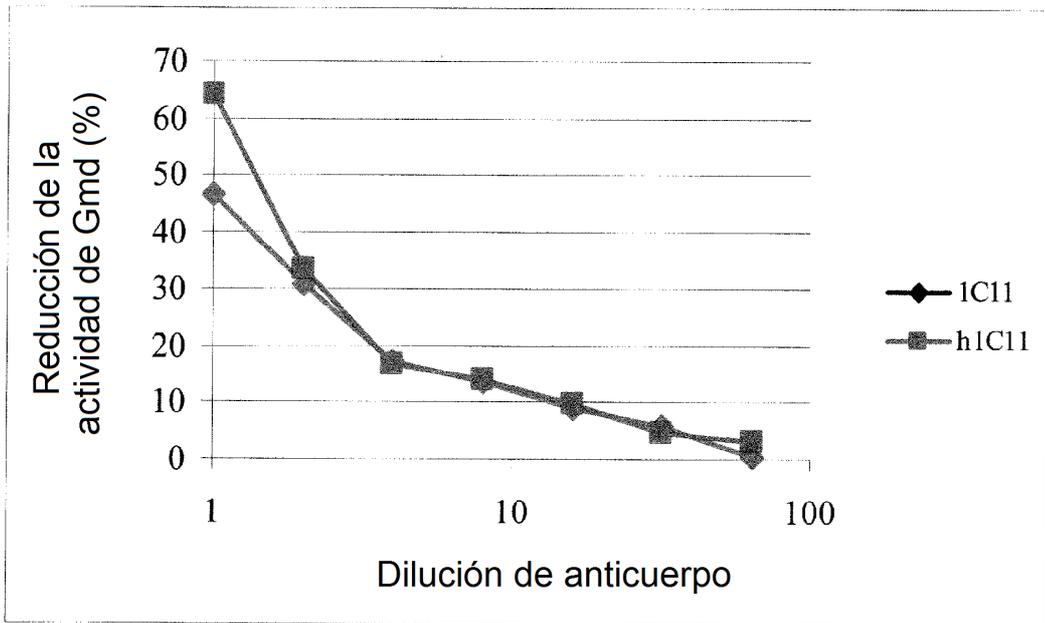


FIG. 23