

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 979**

51 Int. Cl.:

A61K 39/085 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2010 PCT/EP2010/060357**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2011 WO11007004**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2010 E 10734982 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2453915**

54 Título: **Tratamiento de infecciones**

30 Prioridad:

16.07.2009 IE 20090549

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

21.07.2017

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (50.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE y
THE PROVOST, FELLOWS, FOUNDATION
SCHOLARS, & THE OTHER MEMBERS OF
BOARD, OF THE COLLEGE OF THE HOLY &
UNDIV. TRINITY OF QUEEN (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 625 979 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de infecciones

5 **INTRODUCCIÓN**

La presente invención se refiere a una variante del factor A de aglutinación (ClfA) de proteína de unión al fibrinógeno recombinante o fragmento de la misma, donde se altera la capacidad para unir fibrinógeno en comparación con la proteína no mutada o fragmento de la misma. La presente invención también se refiere a vacunas antigénicas microbianas mejoradas, composiciones farmacéuticas, composiciones inmunógenas y anticuerpos que comprenden la variante del factor A de aglutinación (ClfA) de la proteína de unión al fibrinógeno recombinante o fragmento de la misma, y su uso en el tratamiento de infecciones microbianas de origen estafilocócico.

La resistencia a múltiples fármacos (MDR por sus siglas en inglés) es un problema creciente entre bacterias gram positivas, particularmente en hospitales. El uso generalizado de antibióticos y otros agentes para tratar infecciones bacterianas ha conducido al rápido desarrollo de bacterias resistentes a los agentes y muchas bacterias tienen resistencia a múltiples fármacos. Por lo tanto, existe ahora la necesidad de proporcionar terapias mejoradas para tratar estas infecciones resistentes a fármacos.

Los estafilococos son bacterias gram positivas de forma esférica, normalmente dispuestas en racimos irregulares parecidos a uvas. Algunos son miembros de la flora normal de la piel y las membranas mucosas de los seres humanos, otros causan supuración, formación de abscesos, una diversidad de infecciones piógenas e incluso septicemia mortal. Los estafilococos patógenos suelen hemolizar la sangre, coagular el plasma y producir una diversidad de enzimas y toxinas extracelulares.

El género *Staphylococcus* tiene al menos 30 especies. Las tres principales especies de importancia clínica son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, y *Staphylococcus saprophyticus*. *Staphylococcus aureus* es positivo a coagulasa, lo que lo diferencia de las demás especies. *S. aureus* es un patógeno importante para los seres humanos. Casi todas las personas tienen algún tipo de infección por *S. aureus* a lo largo de su vida, que varía en gravedad desde la intoxicación alimentaria o infecciones cutáneas menores hasta infecciones graves que amenazan la vida. Los estafilococos negativos a coagulasa son flora humana normal que a veces causan infección, a menudo asociada con dispositivos implantados, especialmente en pacientes muy jóvenes, ancianos e inmunodeprimidos. Aproximadamente el 75 % de las infecciones causadas por estafilococos negativos a coagulasa se deben a *S. epidermidis*. Las infecciones debidas a *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hominis*, y otras especies son menos comunes. *S. saprophyticus* es una causa relativamente común de infecciones del tracto urinario en mujeres jóvenes. Los estafilococos producen catalasa, que los diferencia de los estreptococos. *S. lugdunensis* también es relevante en un entorno clínico y está presente en aproximadamente el 5 al 10 % de los casos de endocarditis infecciosa.

La colonización de *S. aureus* del cartílago articular, del cual el colágeno es un componente principal, dentro del espacio articular, parece ser un factor importante que contribuye al desarrollo de la artritis séptica. La artritis bacteriana adquirida de forma hematógena sigue siendo un problema médico grave. Esta enfermedad de las articulaciones rápidamente progresiva y altamente destructiva es difícil de erradicar. Típicamente, menos del 50 % de los pacientes infectados se recuperan sin daños graves en las articulaciones. *S. aureus* es el patógeno predominante aislado de pacientes adultos con osteomielitis hematógena y secundaria.

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

Se ha observado un aumento significativo en aislados de *S. aureus* que presentan resistencia a la mayoría de los antibióticos actualmente disponibles para tratar infecciones en hospitales en todo el mundo. El desarrollo de la penicilina para combatir *S. aureus* fue un gran avance en el control y tratamiento de infecciones. Desafortunadamente, surgieron rápidamente organismos resistentes a la penicilina y fue primordial la necesidad de

- nuevos antibióticos. Con la introducción de cada nuevo antibiótico, *S. aureus* ha podido contrarrestar con β -lactamasas, proteínas de unión a la penicilina alteradas y proteínas de la membrana celular mutadas que permiten que la bacteria persista. En consecuencia, han surgido *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) y organismos resistentes a múltiples fármacos que se han instalado firmemente en hospitales y hogares de ancianos de todo el mundo (Chambers, H.F., Clin Microbiol Rev, 1:173, 1988; y Mulligan, M.E., et al., Am J Med, 94:313, 1993). Hoy en día, casi la mitad de las cepas estafilocócicas que causan infecciones nosocomiales son resistentes a todos los antibióticos, excepto a la vancomicina, y parece ser solo cuestión de tiempo que la vancomicina también se vuelva ineficaz.
- 10 Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad muy fuerte y rápidamente creciente de agentes terapéuticos para tratar infecciones de estafilococos tales como *S. aureus*, que son eficaces contra cepas resistentes a antibióticos de las bacterias.
- En patógenos grampositivos, tales como Staphylococcus, Streptococci y Enterococci, las proteínas, denominadas adhesinas, median estas infecciones, por ejemplo promoviendo la colonización, la unión a coágulos sanguíneos y tejido traumatizado. Estas adhesinas superficiales microbianas específicas se denominan MSCRAMM (componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesiva) (Patti, J., et al., Ann Rev Microbiol, 48: 585-617, 1994; Patti, J. y Hook, M., Cur Opin Cell Biol., 6: 752-758, 1994). Los MSCRAMM reconocen y se unen específicamente a componentes de matriz extracelular (ECM), tales como fibronectina, fibrinógeno, colágeno y elastina. Estos MSCRAMM se encuentran en muchos patógenos grampositivos y sus secuencias aminoácidas están relacionadas, tienen un diseño modular similar y organización del dominio de unión común.
- Los MSCRAMM sobre la superficie de la célula bacteriana y los ligandos dentro del tejido huésped interactúan de una forma de llave y cerradura dando como resultado la adherencia de bacterias al huésped. La adhesión es a menudo necesaria para la supervivencia bacteriana y ayuda a las bacterias evadir los mecanismos de defensa del huésped y los desafíos de los antibióticos. Una vez que las bacterias se han adherido y han colonizado con éxito tejidos del huésped, su fisiología se altera drásticamente y los componentes perjudiciales tales como toxinas y enzimas, se secretan. Además, las bacterias adherentes a menudo producen una biopelícula y rápidamente se vuelven resistentes al efecto destructivo de la mayoría de los antibióticos.
- Una bacteria puede expresar MSCRAMM que reconocen una diversidad de proteínas de matriz. Los sitios de unión a ligandos en MSCRAMM parecen estar definidos por tramos contiguos relativamente cortos de secuencias de aminoácidos (motivos). Debido a que un motivo similar se puede encontrar en varias especies diferentes de bacterias, parece que estos motivos funcionales se someten a la transferencia entre especies (Patti y Hook, Cur Opin Cell Biol, 6: 752-758, 1994). Además, un único MSCRAMM a veces puede unirse a varios ligandos de ECM.
- Los MSCRAMM pueden mediar la infección por la unión a proteínas, incluyendo fibrinógeno (Fg) y/o fibronectina (Fn), etc. El fibrinógeno y la fibronectina son proteínas que se encuentran en el plasma sanguíneo y desempeñan un papel clave en la hemostasia y la coagulación.
- El fibrinógeno está compuesto por seis cadenas polipeptídicas, dos A α , dos B β y dos cadenas γ . La parte C-terminal de la cadena γ es biológicamente importante e interactúa con la integrina plaquetaria durante la adherencia y agregación plaquetarias. Es esta región contra la que también se dirige el *Staphylococcus aureus*, dando como resultado la aglutinación celular dependiente del fibrinógeno y la adherencia tisular.
- Staphylococcus aureus* tiene varias proteínas expresadas en superficie que estimulan la activación y la agregación de plaquetas. Las proteínas MSCRAMM de *Staphylococcus aureus* incluyen, pero sin limitación, las siguientes:
- Factor A de aglutinación (ClfA) de la proteína de unión al fibrinógeno;
 - Factor B de aglutinación (ClfB) de la proteína de unión al fibrinógeno;
 - Proteína A de unión a fibronectina-fibrinógeno (FnBPA);
 - Proteína B de unión a fibronectina-fibrinógeno (FnBPB);
 - Proteínas de superficie de *S. aureus* SasA, SasG, SasK, etc.
- La Tabla 1 a continuación expone sucintamente una selección de diversas proteínas de superficie ancladas a la pared celular de *Staphylococcus aureus*.

TABLA 1

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

^aaa, longitud de proteína en aminoácidos.

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

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

^dSortasa para la cual la proteína de superficie de pared celular es un sustrato.

^eTNFR, receptor del factor de necrosis tumoral

^ftambién se une a proteínas en células epiteliales descamadas. Promueve la resistencia a los lípidos bactericidas y a la lactoferrina

^gtambién se une a las células epiteliales nasales descamadas. Implicado en la formación de biopelícula.

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

El análisis estructural tridimensional de ClfA y las proteínas de unión a fibrinógeno relacionadas SdrG y ClfB ha revelado que el dominio A de unión a ligando en todas estas proteínas relacionadas está compuesto por tres subdominios N1, N2 y N3, siendo los residuos 221-559 correspondientes a las Regiones N2-N3 el truncamiento más

pequeño que conserva la capacidad de unirse al fibrinógeno. Se ha encontrado que los residuos de aminoácidos 532 a 538 corresponden a la región peptídica de retención de ClfA. Cada subdominio comprende nueve cadenas β que forman un nuevo pliegue de tipo IgG. El sitio de unión al péptido de la cadena y del fibrinógeno en estas proteínas está situado en un surco hidrófobo en la unión entre N2 y N3. Se ha encontrado que existe una similitud estructural significativa entre la estructura tridimensional de estas proteínas, esto se debe a una o más de la secuencia de aminoácidos relacionada, un diseño modular similar y una organización de dominio de unión común.

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

ClfA es un factor de virulencia para la inducción de artritis séptica en ratones (Josefsson E., Hartford O., O'Brien L, Patti JM, Foster T (2001) Protection against experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. *J Infect Dis* 184: 1572-1580). Además, la eliminación de ClfA junto con otra proteína de unión al fibrinógeno ClfB protegió contra la inflamación sistémica en las primeras etapas de la infección (Palmqvist N, Foster T, Fitzgerald R, Josefsson E, Tarkowski A (2005) Fibronectin-binding proteins and fibrinogen-binding clumping factors play distinct roles in staphylococcal arthritis and systemic inflammation. *J Inf Dis* 191: 791-798).

La proteína de unión al fibrinógeno de *Staphylococcus aureus* ClfA se ha aislado y caracterizado y es el objeto de, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 6.008.341 y 6.177.084. ClfA y ClfB tienen una organización estructural (tridimensional) idéntica y aproximadamente un 27 % de identidad de aminoácidos. FnBPA tiene aproximadamente un 25 % de identidad de aminoácidos con respecto a ClfA. Josefsson E, *et al* (2008) "Fibrinogen Binding Sites P336 and Y338 of Clumping Factor A Are Crucial for *Staphylococcus aureus* Virulence". *PLoS ONE* 3(5): e2206 estudian ClfA en el que P₃₃₆ e Y₃₃₈ únicamente se cambiaron a serina y alanina respectivamente.

En la actualidad no hay vacunas basadas en MSCRAMM aprobadas ni en el mercado. Veronate®, un grupo de inmunoglobulina humana estafilocócica seleccionada por donante intravenosa (IGIV), dirigida contra ClfA y SdrG, tuvo un mal rendimiento en ensayos clínicos de fase III y se retiró de los ensayos. Actualmente se está reevaluando determinar si es un tratamiento viable para infecciones estafilocócicas. Por lo tanto, teniendo en cuenta la prevalencia de la resistencia a múltiples fármacos en bacterias gram positivas y la falta de terapias y vacunas con éxito para estas bacterias resistentes a múltiples fármacos, las terapias alternativas que pueden tratar con tales infecciones bacterianas sin el uso de antibióticos serán de valor significativo.

Además, una mejora en la eficacia sobre cualquier tratamiento o vacunas conocidos será de particular importancia, especialmente en un entorno clínico.

Por lo tanto, la presente invención está dirigida a proporcionar un factor A de aglutinación (ClfA) de proteína de unión a fibrinógeno recombinante mejorado, idealmente para su uso en la terapia de infecciones bacterianas.

ESTADO DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un factor A de aglutinación de proteína de unión al fibrinógeno recombinante (ClfA) o fragmento del mismo que comprende al menos los residuos de aminoácidos 221 a 531 de la región de unión al fibrinógeno, con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID n.º 1 a 3 o una secuencia aminoacídica al menos un 90 % idéntica a las SEQ ID Nos. 1 a 3, donde el residuo aminoacídico D₃₂₁ está sustituido con tirosina (D₃₂₁Y) y P₃₃₆ e Y₃₃₈ está sustituido con serina o alanina para dar como resultado rClfA D₃₂₁Y P₃₃₆S Y₃₃₈A o rClfA D₃₂₁Y P₃₃₆A Y₃₃₈S Y₃₃₈S y la proteína recombinante tiene capacidad reducida o carece de la capacidad de unirse no covalentemente al fibrinógeno en comparación con la

5 proteína no mutada o fragmento de la misma, estimula una mayor respuesta inmune a las infecciones por Staphylococci que la proteína C1fA de tipo silvestre. De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una proteína de unión al fibrinógeno recombinante, o fragmento de la misma, de la invención para su uso en el tratamiento o profilaxis de infecciones microbianas, incluyendo sepsis, artritis séptica y/o endocarditis, preferentemente causadas por Staphylococci.

10 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona el uso de la proteína recombinante, o fragmento de la misma, de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una infección microbiana, preferentemente causada por Staphylococci.

15 De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona una construcción de ácido nucleico, una proteína de fusión, un vector de expresión o una célula huésped que expresa la proteína recombinante, o fragmento de la misma, de la invención.

De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se proporciona una vacuna que comprende la proteína recombinante, o fragmento de la misma, de la invención.

20 De acuerdo con un sexto aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo contra la proteína recombinante, o fragmento de la misma, de la invención, preferentemente en forma de suero hiperinmune.

De acuerdo con un séptimo aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica inmunógena que comprende la proteína recombinante, o fragmento de la misma, de la invención, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

25 De acuerdo con un octavo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para preparar una composición inmunógena que comprende la etapa de añadir el excipiente farmacéuticamente aceptable a la proteína recombinante, o fragmento de la misma, de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

30 En esta memoria descriptiva, se entenderá que los términos "adhesina", "MSCRAMM" y la expresión "proteínas ancladas a la pared celular" son intercambiables e incluyen todas las proteínas de unión al ligando derivadas de microbios. Idealmente, estas proteínas se unen a fibrinógeno, hemo o hemoglobina, haptoglobina-hemoglobina, hemina, colágeno y otros de dichos ligandos. La expresión proteínas "tipo MSCRAMM" pretenden incluir proteínas o
 35 adhesinas que tienen secuencias de aminoácidos relacionadas, un diseño modular similar y/o una organización del dominio de unión común/similar a dichas proteínas MSCRAMM, tales como proteínas de Igd. Idealmente, las proteínas de tipo MSCRAMM tienen una organización de dominio de unión/diseño modular similar. Adicionalmente, las proteínas de tipo MSCRAMM pueden tener al menos un 50 %, preferentemente un 60 %, preferentemente un 75 %, más preferentemente un 85 %, aún más preferentemente un 95 %, aún más preferentemente un 99 % o más de
 40 identidad de secuencia de aminoácidos con las proteínas MSCRAMM. Cualquier referencia en el presente documento a MSCRAMM se entenderá que es intercambiable con el factor A de aglutinación (C1fA) de proteína de unión a fibrinógeno recombinante.

45 También se entenderá que cualquiera de los porcentajes de identidades u homologías a los que se hace referencia en la memoria descriptiva se determinan usando los procedimientos convencionales disponibles en toda la longitud de la secuencia.

El término "microorganismo", "microbio", "microbiano" o similar, incluye, pero sin limitación, organismos que incluyen bacterias, hongos, virus, levaduras y/o mohos.

50 La expresión "cantidad inmunológicamente eficaz" incluye las cantidades que son capaces de estimular una respuesta de linfocitos B y/o linfocitos T.

55 Se entenderá que el factor A de aglutinación de la proteína de unión al fibrinógeno recombinante mejorado, o fragmento del mismo, de la invención tiene una capacidad reducida o carece de la capacidad para unirse no covalentemente al fibrinógeno en comparación con la proteína de tipo silvestre o no mutada.

60 También se entenderá que el fragmento del factor A de aglutinación de la proteína de unión al fibrinógeno recombinante tiene sustancialmente la misma actividad inmunógena que la proteína de longitud completa. De esta manera, el fragmento es capaz de provocar una respuesta inmune similar a la de la proteína de longitud completa.

También se entenderá que el factor A de aglutinación de la proteína de unión al fibrinógeno recombinante o fragmento del mismo, está mutado o alterado, es decir, experimenta una sustitución, inserción, delección o adición de nucleótidos o aminoácidos en el residuo de interés, o adyacente al residuo de interés. El término "adyacente" pretende incluir un residuo de aminoácido inmediatamente adyacente o a una distancia de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos en cualquier lado (N o C-terminal) al aminoácido de interés.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, el factor A de aglutinación (ClfA) de la proteína de unión al fibrinógeno recombinante o fragmento del mismo de la reivindicación 1 tiene capacidad reducida o carece de la capacidad para unirse no covalentemente al fibrinógeno.

La unión al fibrinógeno se puede medir fácilmente usando técnicas convencionales usadas en los Ejemplos. Se ha encontrado que la variante del factor de aglutinación (ClfA) de la proteína de unión al fibrinógeno recombinante o fragmento del mismo de la invención tiene una capacidad alterada para unirse al fibrinógeno en comparación con una proteína no mutada o de tipo silvestre o fragmento de la misma.

Se ha establecido que los residuos aminoacídicos 221 a 559, que incluyen las regiones N2 y N3, de ClfA desempeñan un papel importante en la unión al fibrinógeno y son la región de unión al fibrinógeno mínima. Se ha encontrado inesperadamente que la mutación de residuos de aminoácidos en esta región da como resultado una proteína expresada que puede reconocerse por las defensas inmunitarias del huésped pero carece de unión al fibrinógeno y, por lo tanto, reduce la virulencia asociada. Esta región (el dominio de unión al fibrinógeno de 339 aminoácidos) de ClfA tiene una estructura tridimensional específica, un denominado pliegue de IgG de la variante DE, y es el truncamiento de unión a Fg mínimo que si se altera (a través de sustitución o delección, etc.) puede proporcionar una terapia mejorada.

La alteración para dar como resultado la pérdida de la actividad de unión al fibrinógeno puede tener lugar por sustitución, adición o inserción o delección en los nucleótidos o los aminoácidos. Idealmente, la sustitución afecta negativamente a la estructura tridimensional (por ejemplo, del denominado pliegue de IgG de la variante DE) de la proteína o fragmento de modo que ya no puede unirse al fibrinógeno. Idealmente, la sustitución de nucleótidos o aminoácidos reduce la interacción no covalente con fibrinógeno, preferentemente impidiendo la unión del ligando al bolsillo hidrófobo que separa N2 y N3 de la Región A de la proteína de unión al fibrinógeno. Como alternativa, la región del péptido de retención correspondiente a los aminoácidos 532 a 538 puede alterarse por sustitución o suprimirse para evitar la unión al ligando. Adicionalmente, puede usarse un truncamiento/fragmento que carece de la región peptídica de retención y, opcionalmente, el resto de los residuos de la proteína C-terminal, es decir, que carece de los residuos aminoacídicos 532 a 559. El sitio de unión al péptido de la cadena y del fibrinógeno está situado en un surco hidrófobo en la unión entre N2 y N3 de ClfA. Por lo tanto, las sustituciones o delecciones mencionadas anteriormente están diseñadas para alterar la interacción proteínas MSCRAMM-ligando y prevenir la unión no covalente de ClfA al fibrinógeno.

Por lo tanto, se ha encontrado que al alterar el factor A de aglutinación (ClfA) de la proteína de unión al fibrinógeno recombinante o fragmento del mismo de esta manera, es posible proporcionar una proteína de unión al ligando sin la capacidad de unirse a su ligando, lo que estimula una mayor respuesta inmune tras la inmunización que la proteína de tipo silvestre. Esto reduce la inflamación sistémica, disminuyendo así la virulencia microbiana. En consecuencia, este ClfA de unión al ligando alterado o proteína tipo ClfA que carece de la capacidad de unirse a su ligando, se puede utilizar ventajosamente en el tratamiento de las infecciones microbianas.

Adicionalmente, se ha encontrado sorprendentemente que la alteración del residuo de aminoácido D₃₂₁ específico con respecto a tirosina, proporciona una proteína más estable en comparación con otras variantes de proteína. Como se muestra en el Ejemplo 4, la proteína ClfA D₃₂₁YP₃₃₆SY₃₃₈A (mutante triple) es más fácil de purificar que ClfA P₃₃₆SY₃₃₈A sin la mutación D₃₂₁.

Estos hallazgos presentan una nueva y valiosa vacuna/inmunización terapéutica frente a infecciones bacterianas que proporciona mejores resultados cuando se compara con una vacuna o inmunización terapéutica derivada de la proteína de tipo silvestre.

ClfA es una proteína de 993 aminoácidos, que comprende un dominio de unión a fibrinógeno de 520 aminoácidos (de los aminoácidos 40 a 559). Este dominio de unión al fibrinógeno es el dominio A del extremo N que comprende las subregiones N1, N2 y N3. Se entenderá que toda la región de fibrinógeno que abarca N1 a N3 desde el aminoácido 40 hasta el aminoácido 559, se puede usar en la invención. Como alternativa, se puede usar un truncamiento de la región N1 a N3, por ejemplo, 221 a 559 (la región mínima de unión al fibrinógeno). Idealmente,

pueden usarse las subregiones N2 y N3, la región mínima de unión al fibrinógeno, que corresponden a los residuos de aminoácidos 221 a 559. Como alternativa, se puede usar un fragmento de estas subregiones.

Se establece que la primera etapa en la unión de un MSCRAMM a su ligando implica una interacción no covalente a través del modelo DLL. Estas son las principales interacciones no covalentes de MSCRAMM con el ligando. Las fases finales en la unión al ligando de MSCRAMM implican interacciones covalentes. El modelo DLL fue elucidado a partir de la estructura tridimensional de SdrG en complejo con su ligando. Ahora se ha demostrado que ClfA actúa por una menor variación del mecanismo de DLL (Ganech et al (2008) "A structural model of the *Staphylococcus aureus* ClfA-fibrinogen interaction opens new avenues for the design of anti-staphylococcal therapeutics". PLoS Pathog 4(11); e1000226). El modelo DLL se refiere específicamente a las interacciones no covalentes implicadas en la unión al ligando.

Se ha encontrado que la proteína recombinante, o fragmento de la misma, de la invención, ha reducido o carece de la capacidad de unirse no covalentemente a su ligando huésped debido a una acoplamiento, bloqueo y retención alterados. Una o más de las etapas de acoplamiento, bloqueo o retención pueden alterarse. Por lo tanto, se postula que, de acuerdo con la invención, la unión no covalente que tiene lugar durante la unión, a través de acoplamiento, bloqueo y retención (DLL), de la proteína MSCRAMM o la proteína tipo MSCRAMM (es decir, ClfA) a su ligando puede ser reducida o puede prevenirse.

En relación con los MSCRAMM ClfA/ClfB en particular, se ha encontrado que el dominio de unión al ligando mínimo comprende las subregiones N1 a N3 de la Región A, específicamente las subregiones N2 y N3 que comprenden un pliegue de Ig de la variante Dev-IgG. El pliegue de Ig de la variante Dev-IgG es una nueva variante del motivo de inmunoglobulina también denominada variante DE. Se postula que un bolsillo hidrófobo formado entre los dos dominios DEv-IgG de ClfA/B es el sitio de unión al ligando para la cadena γ de fibrinógeno. Esencialmente, el ligando se une a la ranura hidrófoba que separa N2 y N3. Específicamente, durante la unión al ligando, el componente peptídico desplegado del ligando se inserta en la ranura situada entre los subdominios N2 y N3. El péptido de retención en el extremo C del subdominio N3 experimenta un cambio conformacional e inserta entre dos cadenas beta en el subdominio N2, bloqueando así el ligando en su lugar. De hecho, la sustitución mutagénica de los residuos Tyr256, Pro336, Tyr338 y Lys389 en el factor de aglutinación, que se propone poner en contacto con los residuos terminales ⁴⁰⁸AGDV⁴¹¹ de la cadena γ de fibrinógeno, dio como resultado proteínas sin ninguna afinidad o notablemente reducida para el fibrinógeno.

Se entenderá que se puede usar la proteína de unión al ligando completa, el dominio de unión al ligando, el dominio de unión al ligando mínimo o un fragmento de la misma. El uso de proteínas truncadas de la proteína de unión al ligando, tal como el dominio de unión al ligando, el dominio de unión al ligando mínimo, o el uso de fragmentos de las mismas es ventajoso para facilitar la fabricación y superación de otros problemas, tales como la escisión no deseada de la proteína. Por ejemplo, el péptido de retención, presente en el dominio de unión al ligando mínimo, puede eliminarse/retirarse o alterarse. Por ejemplo, el péptido de retención en ClfA corresponde a los aminoácidos de la Región A 532 a 538. Estos residuos pueden alterarse, sustituirse o eliminarse/retirarse para evitar que el ligando se una al MSCRAMM a través de DLL. De esta manera se evita la "retención" de DLL del MSCRAMM a su ligando. Esta "retención" se produce por medio de una interacción no covalente. En una realización, el péptido de retención se elimina en su totalidad junto con los residuos de aminoácidos C-terminales de la Región A restantes. De acuerdo con otra realización, la región peptídica de retención solamente se elimina. De acuerdo con otra realización más, la región peptídica de retención experimenta una sustitución aminoacídica para dar como resultado la reducción o prevención de la unión/retención al ligando.

Además, dichas alteraciones en el dominio de unión al ligando pueden tener lugar a nivel de aminoácidos, mediante sustitución o delección de aminoácidos, utilizando la proteína de longitud completa, el dominio de unión al ligando, el dominio de unión al ligando mínimo o fragmento de los mismos. Se entenderá que pueden usarse también proteínas o fragmentos de las mismas con homología suficientemente alta a la proteína de unión al ligando. La alta homología como se define en el presente documento se produce cuando al menos el 50 %, preferentemente el 60 %, preferentemente el 70 %, preferentemente el 80 %, más preferentemente el 90 %, aún más preferentemente el 95 %, aún más preferentemente del 95 % al 99 % y aún más preferentemente el 99 % o más de los nucleótidos coinciden en toda la longitud de la secuencia de ADN o cuando se usan en relación con las secuencias aminoacídicas cuando las secuencias aminoacídicas no son idénticas pero producen una proteína que tiene la misma funcionalidad y actividad. Se entenderá que estos comentarios sobre la alta homología también pueden estar relacionados con la estructura tridimensional de la proteína, es decir, la organización del dominio de unión modular.

Se entenderá que la proteína de unión al fibrinógeno recombinante puede comprender opcionalmente además una o más sustituciones de residuos de nucleótidos o aminoácidos, mutaciones puntuales, inserciones, delecciones o

adiciones en la región de unión al fibrinógeno.

La elección de residuos se basó en la estructura cristalina de rayos X de ClfA y la observación de que los cambios individuales en la prolina o la tirosina reducían la afinidad de unión. Sorprendentemente, se encontró que esta proteína ClfA mutante (rClfA D₃₂₁Y P₃₃₆S Y₃₃₈A y rClfA P₃₃₆A Y₃₃₈S) estimuló una respuesta inmune y se puede utilizar en la generación de una vacuna o terapia de anticuerpos mucho más eficaz. Esta sustitución puede tener lugar en la proteína de unión al fibrinógeno de longitud completa, la región de unión al fibrinógeno, la región mínima de unión al fibrinógeno, o un fragmento de la misma.

10 Las siguientes secuencias descritas en la tabla a continuación se pueden usar de acuerdo con la invención.

SEQ ID No	Descripción	Longitud	Región A
1	Secuencia de aa de longitud completa de rClfA wt (Ejemplo 1)	933 aa	-
2	Secuencia de ADN de longitud completa de la Región A de rClfA wt (Ejemplo 1)	1560 nucleótidos	N1 a N3
3	Secuencia de aa de longitud completa de la Región A de rClfA wt (Ejemplo 1)	520 aa	N1 a N3
4	Región A de rClfAPYI (Ejemplo 1)	520 aa	N1 a N3
5	Región A de rClfAPYII (Ejemplo 1)	520 aa	N1 a N3
6	Secuencia de aa de longitud completa de la Región A de rClfA wt con residuos de los extremos N y C adicionales ¹ (Ejemplo 2)	530 aa	N1 a N3
7	Región A de rClfAPYI A con residuos de los extremos N y C adicionales ¹ (Ejemplo 1)	530 aa	N1 a N3
8	Región A de rClfAPYII con residuos de los extremos N y C adicionales	530 aa	N1 a N3
9	rClfA 221-559 (Ejemplo 2)	339 aa	N2 y N3
10	rClfA 221-559 con residuos de los extremos N y C adicionales ¹ (Ejemplo 2)	349 aa	N2 y N3
11	rClfA 221-531 (truncamiento de retención delta) con residuos de los extremos N y C adicionales ² (Ejemplo 2)	321 aa	N2 y N3 ³

¹ Los residuos de N adicionales (extensión N-terminal (6 x etiqueta His y residuos adicionales) comprenden 6 residuos His seguidos de Gly y Ser. Los residuos C terminales adicionales comprenden Lys seguido de Leu (pueden usarse otros residuos N y C terminales adicionales - dependiendo del cebador usado o las etiquetas N/C terminales requeridas)

² Los residuos de N adicionales (6 x etiqueta His y residuos adicionales) comprenden 6 residuos His seguidos de Gly y Ser. Los residuos C terminales adicionales comprenden Arg seguido de Ser (pueden usarse otros residuos N y C terminales adicionales - dependiendo del cebador usado o las etiquetas N/C terminales requeridas))

³ sin el péptido de bloqueo correspondiente a los residuos de aa 532 a 538 y los residuos C-terminales de la Región A restantes, es decir, que carecen de los residuos aminoácidos 532 a 559.

Como alternativa, el fragmento de la proteína de unión al fibrinógeno estafilocócico recombinante comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID No: 4 a la SEQ ID No: 11. Las SEQ ID No: 4 y 15 5 corresponden al dominio A de ClfA N1, N2, N3 solamente, rClfA D₃₂₁Y P₃₃₆S Y₃₃₈A y rClfA P₃₃₆A Y₃₃₈S, respectivamente, como se expone sucintamente en la tabla anterior.

También se postula, en base a las sustituciones en la retención que se realizaron en SdrG, que las sustituciones en la retención que son defectuosas en el cambio conformacional o en la complementación de la cadena beta también serán defectuosas en la unión al ligando. Por lo tanto, idealmente, las sustituciones están en los residuos de aminoácidos 532 a 538 que corresponden al péptido de retención y afectan a la capacidad del péptido de experimentar un cambio conformacional, o de unirse al ligando o ambos. Como alternativa, la alteración puede comprender la eliminación de los residuos de aminoácidos 532 a 538 (péptido de retención delta) en conjunto, para dar resultados similares. Adicionalmente, un mutante de truncamiento C-terminal que carece de los residuos

aminoacídicos 532 a 559 (incluyendo los residuos peptídicos de retención) también realizará la unión al ligando.

- Sin embargo, también se contemplará que pueden sustituirse otros residuos de aminoácidos distintos de los específicamente citados anteriormente. Por ejemplo, Glu 526, Val 527, Tyr 256 y Lys 389 pueden estar sustituidos para alterar las propiedades de unión al fibrinógeno de la proteína o fragmento de la misma. Por lo tanto, puede contemplarse cualquier sustitución que reduzca la capacidad de unión. Idealmente, tales sustituciones o deleciones afectan al bolsillo hidrófobo y el mecanismo asociado para unir el ligando en la zanja hidrófoba tal como los homólogos Val527 en ClfA y N526 en ClfB. En ClfB, se han estudiado Q235 y N526 para demostrar que reducen la unión. Un estudio similar se realizó con FnBPA, donde se demostró que N304 y F306 son importantes para la unión a Fg. Por lo tanto, las mutaciones en estos residuos de aminoácidos afectarán a la unión al ligando. Por lo tanto, de acuerdo con una realización adicional de este aspecto de la invención, la proteína de unión al fibrinógeno recombinante puede comprender además la sustitución de aminoácidos donde los restos aminoacídicos Ala254, Tyr256, Pro336, Tyr338, Ile387, Lys389, Glu526 y/o Val527 están sustituidos con Ala o Ser.
- 15 Se entiende que todas las proteínas de la familia Clf-Sdr se unen a ligandos por el modelo DLL. Mediante el modelado de la estructura tridimensional, es posible predecir el péptido de retención y hacer un truncamiento que carezca de este, ya sea en longitud completa (N1 a N3) o el truncamiento de unión a ligando mínimo N2-N3, o un fragmento de los mismos.
- 20 Se encontró que estas proteínas rClfA de sustitución (ya sean mutantes de deleción, sustituciones o truncamientos) redujeron la virulencia y el desenlace de la enfermedad, y sorprendentemente indujeron menos inflamación sistémica que la proteína de tipo silvestre.

Por lo tanto, se espera que la inmunización con estas proteínas mutantes, basada en las proteínas ensayadas, mejore el nivel de anticuerpos que reconocen tanto la proteína mutante como de tipo silvestre y que proporcionen una respuesta inmune mayor que la proteína de tipo silvestre.

Se entenderá que la proteína de unión a fibrinógeno estafilocócico recombinante, o fragmento de la misma, de la invención puede usarse en el tratamiento de infecciones microbianas, preferentemente infecciones estafilocócicas tales como en el tratamiento de sepsis, artritis séptica y/o endocarditis, u otras afecciones o patologías similares.

La región de unión al fibrinógeno de la proteína se altera de manera que ya no se una al fibrinógeno. Como se ha indicado anteriormente, la alteración puede tener lugar a nivel de los nucleótidos o los aminoácidos. Se entenderá que pueden usarse también proteínas o fragmentos de las mismas con homología suficientemente alta a la proteína de unión al fibrinógeno. La alta homología como se define en el presente documento, se produce cuando al menos 90 de los nucleótidos coinciden en toda la longitud de la secuencia de ADN o cuando se usan en relación con las secuencias aminoacídicas cuando las secuencias aminoacídicas no son idénticas pero producen una proteína que tiene la misma funcionalidad y actividad. Se entenderá que estos comentarios sobre la alta homología también pueden estar relacionados con la estructura tridimensional de la proteína.

Se entenderá que se puede usar la proteína de unión al fibrinógeno completa, la región de unión al fibrinógeno, la región mínima de unión al fibrinógeno, o un fragmento de la misma, que comprende al menos los residuos de aminoácidos 221 a 531 de la región de unión al fibrinógeno. El uso de proteínas truncadas o fragmentos de las mismas es ventajoso para facilitar la fabricación y superación de otros problemas tales como escisión no deseada de la proteína.

Las ventajas de usar una proteína truncada o fragmento de la misma, que comprende, por ejemplo, uno o más subdominios de la región de unión a ligando-fibrinógeno solamente, se refieren a la capacidad de purificar la proteína a altos rendimientos sin degradación.

La región de unión al fibrinógeno de la proteína ClfA, denominada de otro modo como la Región A, comprende 3 subregiones, N1, N2 y N3. Por lo tanto, el fragmento inmunógeno puede comprender las subregiones N1, N2 y/o N3 de la región A ClfA o un fragmento de la misma. Por lo tanto, por ejemplo, en relación con ClfA, el fragmento puede comprender uno o más de los subdominios de la Región A, N1, N2 o N3. Idealmente, se puede utilizar N2 y N3 ya que este truncamiento es menos probable que experimente proteólisis (se ha puesto en conocimiento un sitio de escisión de proteasa entre N1 y N2 en ClfA y ClfB) y se puede expresar a niveles más altos en E. coli. N2 y N3 son la región mínima de unión al fibrinógeno de las proteínas Clf.

Se ha encontrado inesperadamente que esta proteína de unión al fibrinógeno, truncamiento o fragmento de la misma, sin la capacidad de unirse al fibrinógeno estimula una mayor respuesta inmunitaria tras la inmunización que

- la proteína de tipo silvestre que se une al fibrinógeno de la manera normal. Ventajosamente, esta proteína de unión al fibrinógeno alterada no provoca inflamación sistémica cuando se expresa por *S. aureus*, por lo tanto, se disminuye la virulencia microbiana. En consecuencia, esta proteína alterada que carece de la capacidad para unirse a fibrinógeno se puede utilizar ventajosamente en el tratamiento de infecciones microbianas. También se ha encontrado contrario a las expectativas que el efecto de protección de la proteína de unión al fibrinógeno alterada es mayor que la proteína de tipo silvestre. Se ha encontrado que una composición farmacéutica o vacuna que comprende tal proteína recombinante alterada es más eficaz que una composición farmacéutica o vacuna que comprende la misma proteína recombinante en una forma inalterada (tipo silvestre), tal como ClfA, ClfB, SdrG, etc.
- 5
- 10 Por lo tanto, estos hallazgos presentan una nueva y valiosa vacuna/inmunización terapéutica frente a infecciones bacterianas que proporciona mejores resultados en comparación con la proteína de tipo silvestre cuando se usa también como vacuna/inmunización terapéutica.
- Se entenderá que la proteína alterada de la invención, se puede utilizar en la generación de anticuerpos, incluyendo
- 15 anticuerpos monoclonales, policlonales, quiméricos, humanizados o fragmentos de los mismos, para su uso en el tratamiento de tales infecciones microbianas. Pueden proporcionarse entonces composiciones que incluyen tales anticuerpos, tales como un suero hiperinmune, y estas composiciones pueden usarse en el tratamiento de pacientes infectados con infecciones por *Staphylococcus*.
- 20 Por lo tanto, las proteínas o fragmentos activos de las mismas pueden usarse para inhibir la unión de *Staphylococci* a la matriz extracelular (ECM) y para prevenir/tratar infecciones por *Staphylococci* en un paciente.
- Además, las proteínas o fragmentos activos de las mismas, y anticuerpos para las proteínas son útiles en el tratamiento de infecciones estafilocócicas, para el desarrollo de vacunas para la vacunación activa o pasiva, y
- 25 cuando se administran como una composición farmacéutica a una herida o un dispositivo médico, tanto las proteínas como los anticuerpos son útiles como agentes bloqueantes para prevenir la infección microbiana. Por ejemplo, estas proteínas o fragmentos de las mismas, pueden usarse en vacunas activas, y los anticuerpos para estas proteínas en vacunas pasivas.
- 30 Estas vacunas y productos descritos en el presente documento presentan una mejora significativa con respecto a la técnica anterior, que indica el uso general de MSCRAMM para impartir inmunización, pero no indica las vacunas o productos inesperados y mejorados descritos en el presente documento.
- La preparación de proteínas, ADN y anticuerpos se conoce bien en la técnica y no se describirá en detalle en el
- 35 presente documento. Las técnicas convencionales se utilizan idealmente en la generación de estas moléculas. También se entenderá que la invención incluye construcciones de ácido nucleico que contienen la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de interés, células huésped recombinantes que contienen dichas construcciones de ácido nucleico para expresar la proteína de interés, y composiciones inmunógenas.
- 40 Para la administración, la composición proteica puede dispersarse en una solución salina isotónica estéril u otro adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- Se entenderá que la vacuna puede ser una vacuna de ADN o proteína.
- 45 La inmunización puede tener lugar mediante la inyección de ADN, proteína o anticuerpos. Como alternativa, se puede administrar un organismo vivo atenuado que incluye y expresa el ADN.
- La cantidad de ADN, proteína o anticuerpos que se pueden administrar dependerá de varios factores atenuantes, incluyendo la dependencia de la fuerza del activador, la expresión de la proteína y la inmunogenicidad del gen
- 50 expresado. Estos pueden alterarse para cada nueva aplicación para obtener la cantidad inmunológicamente eficaz deseada requerida.
- También se desvela en el presente documento un procedimiento para inducir una respuesta inmune en un individuo y/o para tratar a un paciente que tiene una infección microbiana, que comprende administrar al individuo una
- 55 proteína de unión al fibrinógeno recombinante, o fragmento de la misma de la invención.
- De acuerdo con una realización preferida adicional de la invención, se proporciona una vacuna que comprende una proteína de unión al fibrinógeno recombinante, o fragmento de la misma, de la invención.
- 60 De acuerdo con una realización aún más preferida de la invención, se proporciona un anticuerpo contra una proteína

de unión al fibrinógeno recombinante, o fragmento de la misma de la invención, preferentemente en forma de suero hiperinmune.

De acuerdo con una realización aún más preferida de la invención, se proporciona una composición farmacéutica inmunógena que comprende una proteína de unión al fibrinógeno recombinante, o fragmento de la misma de la invención, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

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

En la memoria descriptiva, los términos "comprenden, comprende, comprendido y que comprende" o cualquier variación de los mismos y los términos "incluyen, incluye, incluido y que incluye", "consisten, consiste, constituido por y que consiste" o cualquier variación de los mismos se consideran como totalmente intercambiables y a todos ellos debería otorgarse la interpretación más amplia posible.

La presente invención se describirá ahora con referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitativos. Las figuras 1 a 15 muestran los resultados del Ejemplo 1.

La figura 1 muestra la gravedad de la artritis (A), medida como índice artrítico, y la pérdida de peso (B) en ratones inoculados con la cepa de *S. aureus* Newman, y los mutantes *clfAPYI*, *clfAPYII*, y el mutante nulo *clfA*. Se inocularon $3,2 \times 10^6$ - $6,0 \times 10^6$ ufc de las cepas de *S. aureus*. Los datos se presentan como medianas (cuadrados o líneas centrales), intervalos intercuartiles (cajas), e intervalos centrales al 80 % (bigotes). Se agrupan los datos de tres experimentos. $N_{\text{Newman}} = 27 - 30$, $N_{\text{clfAPYI}} = 30$, $N_{\text{clfAPYII}} = 10$, y $N_{\text{clfA}} = 16 - 20$.

La figura 2 muestra el crecimiento bacteriano en los riñones en ratones 7-8 días después de la inoculación con $3,2 \times 10^6$ - $6,0 \times 10^6$ ufc de la cepa de *S. aureus* Newman, y los mutantes *clfAPYI*, *clfAPYII*, y el mutante nulo *clfA*. Los datos se presentan como ufc por par de riñones. Cuando no se detectó crecimiento, el recuento se puso en el recuento más alto posible según la dilución que se utilizó. Se agrupan los datos de tres experimentos. $N_{\text{Newman}} = 26$, $N_{\text{clfAPYI}} = 30$, $N_{\text{clfAPYII}} = 10$, y $N_{\text{clfA}} = 15$.

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

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

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

La figura 6 muestra la frecuencia de los ratones artríticos inoculados con $3,2 \times 10^6$ - $6,0 \times 10^6$ ufc de la cepa de *S. aureus* Newman de tipo silvestre, y los mutantes *clfAPYI*, *clfAPYII*, y el mutante nulo *clfA*. Se agrupan los datos de tres experimentos. $N_{\text{Newman}} = 27 - 30$, $N_{\text{ClfAPYI}} = 30$, $N_{\text{ClfAPYII}} = 10$, y $N_{\text{ClfA}} = 16 - 20$.

La figura 7 muestra la gravedad de la artritis medida como el índice artrítico en ratones inoculados con $5,2$, $5,1$ o $3,3 \times 10^7$ ufc de la cepa de *S. aureus* Newman de tipo silvestre, el mutante *clfAPYI* o el mutante nulo *clfA*, respectivamente. Los datos se presentan como medianas (cuadrados), intervalos intercuartiles (cajas), e intervalos centrales al 80 % (bigotes). $N_{\text{Newman}} = 0-10$, $N_{\text{clfAPYI}} = 9-10$, y $N_{\text{ClfA}} = 0-10$.

La figura 8 muestra la pérdida de peso en ratones inoculados con $5,2$, $5,1$ o $3,3 \times 10^7$ ufc de la cepa de *S. aureus* Newman de tipo silvestre, el mutante *clfAPYI* o el mutante nulo *clfA*, respectivamente. Los datos se presentan como medianas (línea central), intervalos intercuartiles (cajas), e intervalos centrales al 80 % (bigotes). $N_{\text{Newman}} = 0-10$, $N_{\text{ClfAPYI}} = 9-10$, y $N_{\text{ClfA}} = 0-10$.

La figura 9 muestra la gravedad de la artritis medida como el índice artrítico en los ratones inmunizados con BSA, ClfA recombinante o ClfAPY recombinante (es decir, el dominio A de la proteína recombinante ClfAPYI) e inoculados con $4,0 \times 10^6$ ufc de *S. aureus* Newman. Los datos se presentan como medianas (cuadrados), intervalos intercuartiles (cajas), e intervalos centrales al 80 % (bigotes). $N_{\text{BSA}} = 14$, $N_{\text{ClfAPY}} = 14$, y $N_{\text{ClfA}} = 15$ por grupo desde el inicio.

La figura 10 ofrece la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la proteína del dominio A de ClfA de tipo silvestre (rClfA), dominios N123 solamente, con los residuos destacados que se alteran en los siguientes ejemplos, D₃₂₁, P₃₃₆ e Y₃₃₈ para dar lugar a rClfAPYI y P₃₃₆ e Y₃₃₈rClfAPYII (SEQ ID No.3). Es este dominio de proteína A recombinante el que se usó en vacunación en los siguientes ejemplos.

La figura 11 muestra una representación ilustrativa de la estructura de las proteínas FnBPA, ClfB, ClfA y SdrG. La Región A es la región de unión al fibrinógeno, S es la secuencia señal, W es el dominio que abarca la pared celular, M es el anclaje de la membrana incluyendo el motivo LPXTG, + representa residuos cargados positivamente y R es la región de repetición. En ClfA, la Región A comprende N123 (no mostrado). La región BCD de FnBPA (y la región

CD más corta de FnBPB - no mostrada) se une a fibronectina.

La figura 12 muestra las respuestas a anticuerpo específicas para ClfAPY40-559 recombinante en muestras en suero de ratones inmunizados con albúmina sérica bovina (BSA), ClfA40-559 recombinante (rClfA), o ClfAPY40-559 recombinante (rClfAPY), 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo, que fue un día antes de la infección con $2,3 \times 10^7$ ufc/ratón de la cepa de *S. aureus* Newman de tipo silvestre para la inducción de sepsis. Los datos se presentan como medias (líneas centrales), intervalos intercuartiles (cuadrados), e intervalos centrales al 80 % (bigotes). $N_{BSA} = 13-15$, $N_{rClfA} = 15$, y $N_{rClfAPY} = 15$.

La figura 13 muestra las respuestas a anticuerpo específicas para ClfA40-559 recombinante en muestras en suero de ratones inmunizados con albúmina sérica bovina (BSA), ClfA40-559 recombinante (rClfA), o ClfAPY40-559 recombinante (rClfAPY), 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo, que fue un día antes de la infección con $2,3 \times 10^7$ ufc/ratón de la cepa de *S. aureus* Newman de tipo silvestre para la inducción de sepsis. Los datos se presentan como medianas (líneas centrales), intervalos intercuartiles (cajas), e intervalos centrales al 80 % (bigotes). $N_{BSA} = 13-15$, $N_{rClfA} = 15$, y $N_{rClfAPY} = 15$.

La figura 14 muestra las respuestas a anticuerpo específicas para ClfAPY40-559 recombinante en muestras en suero de ratones inmunizados con albúmina sérica bovina (BSA), ClfA40-559 recombinante (rClfA), o ClfAPY40-559 recombinante (rClfAPY), 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo, que fue un día antes de la infección con $4,0 \times 10^6$ ufc/ratón de la cepa de *S. aureus* Newman de tipo silvestre para la inducción de artritis séptica. Los datos se presentan como medianas (líneas centrales), intervalos intercuartiles (cajas), e intervalos centrales al 80 % (bigotes). $N_{BSA} = 14-15$, $N_{rClfA} = 15$, y $N_{rClfAPY} = 15$.

La figura 15 muestra las respuestas a anticuerpo específicas para ClfA40-559 recombinante en muestras en suero de ratones inmunizados con albúmina sérica bovina (BSA), ClfA40-559 recombinante (rClfA), o ClfAPY40-559 recombinante (rClfAPY), 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo, que fue un día antes de la infección con $4,0 \times 10^6$ ufc/ratón de la cepa de *S. aureus* Newman de tipo silvestre para la inducción de artritis séptica. Los datos se presentan como medianas (líneas centrales), intervalos intercuartiles (cajas), e intervalos centrales al 80 % (bigotes). $N_{BSA} = 14-15$, $N_{rClfA} = 15$, y $N_{rClfAPY} = 15$.

La figura 16 del Ejemplo 2 muestra las respuestas a anticuerpos específicas para ClfAPY221-559 recombinante en muestras en suero de ratones inmunizados con albúmina sérica bovina (BSA), ClfA221-559 recombinante (rClfA221-559), o ClfAPY221-559 recombinante (rClfAPY221-559), 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo. Los datos se presentan como medianas (líneas centrales), intervalos intercuartiles (cajas), e intervalos centrales al 80 % (bigotes). $N_{BSA} = 15$, $N_{rClfA221-559} = 14-15$, y $N_{rClfAPY221-559} = 14-15$.

La figura 17 del Ejemplo 2 muestra las respuestas a anticuerpos específicas para ClfA221-559 recombinante en muestras en suero de ratones inmunizados con albúmina sérica bovina (BSA), ClfA221-559 recombinante (rClfA221-559), o ClfAPY221-559 recombinante (rClfAPY221-559), 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo. Los datos se presentan como medianas (líneas centrales), intervalos intercuartiles (cuadrados), e intervalos centrales al 80 % (bigotes). $N_{BSA} = 15$, $N_{rClfA221-559} = 14-15$, y $N_{rClfAPY221-559} = 14-15$.

La figura 18 del Ejemplo 3 muestra las respuestas a anticuerpos específicas para ClfA221-531 recombinante en muestras en suero de ratones inmunizados con ClfAPY221-531 recombinante (rClfAPY221-531), 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo. Los datos se presentan como medias (líneas centrales), intervalos intercuartiles (cajas), e intervalos centrales al 80 % (bigotes). $N_{rClfA221-531} = 14-15$.

La figura 19 proporciona la secuencia nucleotídica y aminoacídica de ClfA₄₀₋₅₅₉ D321Y/P336S/Y338A (ClfAPYI).

La figura 20 proporciona la secuencia nucleotídica y aminoacídica de ClfA₄₀₋₅₅₉ D321Y/P336S/Y338A, incluyendo la extensión N y C-terminal (ClfAPYI).

La figura 21 muestra los resultados del Ejemplo Comparativo 1.

45 EJEMPLOS

Ejemplo 1

Truncamientos de la región A de rClfA que comprenden N1, N2 y 3 (aminoácidos 40-559)

50

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Los detalles completos de las referencias numéricas entre paréntesis dados en los Ejemplos se proporcionan al final de esta sección.

55

Ratones

Se obtuvieron ratones NMRI de Scanbur BK (Sollentuna, Suecia) y se mantuvieron en la instalación para animales del Departamento de Reumatología de la Universidad de Gotemburgo, Suecia. El comité de ética de experimentación animal de Gotemburgo aprobó los experimentos. Se alojaron hasta 10 animales por jaula con un

60

ciclo de luz-oscuridad de 12 h, y se alimentaron con comida estándar de laboratorio y agua ad libitum. Los animales tenían de 6 a 16 semanas de edad al comienzo de los experimentos.

Cepas bacterianas

5 Para la infección de animales, se usaron las cepas de tipo silvestre de *S. aureus* Newman (14) y LS-1 (11) y derivados construidos de las mismas. Los derivados de *clfA* D₃₂₁YP₃₃₆SY₃₃₈A (*clfAPYI*) y *clfA* P₃₃₆AY₃₃₈S (*clfAPYII*) se construyeron en la cepa Newman y se transdujeron a la cepa LS-1 (véase más adelante). Se usaron también los mutantes de delección Newman mutante *clfA2::Tn917* DU5876 (3) y LS-1 mutante *clfA2::Tn917* (J.R. Fitzgerald *et al.*,
10 sin publicar). Las bacterias se cultivaron en placas de agar con sangre durante 48 h, se recogieron y se mantuvieron congeladas a -20 °C en PBS (solución salina tamponada por sus siglas en inglés) que contenía BSA al 5 % (p/vol) (Sigma Chemicals) y dimetilsulfóxido al 10 % (vol/vol). Antes de la inyección en animales, las suspensiones bacterianas se descongelaron, se lavaron en PBS y se ajustaron a las concentraciones celulares apropiadas. El número de bacterias viables se midió en combinación con cada exposición por cultivo en placas de agar con sangre
15 y colonias de recuento.

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

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

- ClfA también puede denominarse como rClfA 40-559 (SEQ ID NO 3);
- ClfA D₃₂₁YP₃₃₆SY₃₃₈A también puede denominarse como *clfAPYI*, *rcfAPY* o *rcfAPYI* (es decir, *clfAPYI* 40-559) (SEQ ID NO 4) (mutante triple); y
- 25 • ClfA P₃₃₆AY₃₃₈S también puede denominarse como *clfAPYII*, *rcfAPYII* (es decir, *clfAPYII* 40-559) (SEQ ID NO 5) (mutante doble).

Un fragmento *PstI*-*Bam*HI de 1,02 kb de pCF77 PY (Loughman *et al.*, 2005) que contenía las mutaciones P₃₃₆S y Y₃₃₈A en *clfA* se clonó en pBluescriptII SK- (Stratagene). Este plásmido se linealizó con *Hind*III y se ligó a *pTsermC*
30 cortado con *Hind*III (J. Higgins, no publicado) para generar el plásmido pARM, que es un vector lanzadera que es un *E. coli*-*S. aureus* sensible a la temperatura que contiene las sustituciones P₃₃₆S y Y₃₃₈A.

Se generó un mutante doble, en el que el orden de las sustituciones se invirtió, produciendo P₃₃₆A e Y₃₃₈S. Para generar esto, se generó un plásmido pJH2, análogo a pARM pero que contenía las sustituciones P₃₃₆A e Y₃₃₈S. Se
35 usó PCR de cebador de superposición con los mismos cebadores flanqueantes usados para producir pCF77 PY (6), y un par diferente de cebadores mutagénicos superpuestos:

F3: GCAACTTTGACCATG**G**CCGCTT**C**TATTGACCCTGAAAATG and
40 R3: CATTTCAGGGTCAATA**G**AAGCGG**C**CATGGTCAAAGTTGC

(mutaciones en negrita y subrayadas) para generar pCF77 PYII. El fragmento *PstI*-*Hind*III de 1,02 kb de este plásmido se usó como se ha descrito anteriormente para generar pJH2, un vector lanzadera de *E. coli*-*S. aureus* sensible a la temperatura que contenía las sustituidas P₃₃₆A e Y₃₃₈S.

45 Tanto pARM como pJH2 se transfirieron a RN4220 (15) por electroporación y posteriormente se transdujeron usando fago 85 (16) a *S. aureus* Newman (14) y LS-1 (11). En estas cepas se indujo a los plásmidos a insertarse en el cromosoma y después a eliminarse, dejando las mutaciones en el cromosoma de una proporción de transformantes, generando Newman *clfAPYI*, Newman *clfAPYII*, LS-1 *clfAPYI* y LS-1 *clfAPYII*. Se seleccionaron los transformantes para determinar la pérdida del plásmido y una pérdida de la actividad de unión al fibrinógeno. La integridad del gen
50 *clfA* se verificó por hibridación Southern usando una sonda *clfA* (datos no mostrados). La expresión de una proteína inmunorreactiva (ClfAPY) se verificó mediante inmunotransferencia Western utilizando un antisuero policlonal de conejo de la región A anti-ClfA (datos no mostrados). Las mutaciones se verificaron por PCR a través de los fragmentos *KpnI*-*Bam*HI del ADN genómico y secuenciación comercial de los productos. Las aproximadamente 700 bases del gen *clfA* de la cepa LS-1 que se secuenciaron eran idénticas a las bases correspondientes en el gen
55 Newman *clfA* de la cepa Newman.

Producción de ClfA y ClfAPY recombinante

Se produjo a partir de pCF40, como se ha descrito anteriormente (17), la región A de ClfA recombinante marcada
60 con His, dominios N123 (aminoácidos 40-559), con una etapa de pulido adicional a través de una columna de

intercambio aniónico. El plásmido pCF77 PY (6) se usó como plantilla para clonar los dominios N123 del clon *clfAPYI* en pQE30 para generar pCF40PY. Usando este plásmido, también se produjo ClfAPY recombinante por cromatografía de afinidad de níquel y cromatografía de intercambio aniónico, como se describió para rClfA. Los eluatos se dializaron frente a dos cambios de PBS antes de la concentración y la liofilización.

5

Experimentos de artritis séptica y sepsis

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

Experimento 1 Los ratones se infectaron por inyección intravenosa con $3,5 \times 10^6$ ufc/ratón de la cepa *S.aureus* Newman o con $4,3 \times 10^6$ ufc/ratón de mutante Newman *clfAPYI*, ambos en 200 μ l de PBS. Se hizo un seguimiento de la artritis clínica y el cambio de peso hasta el día 7. Los ratones se sacrificaron el día 8, se evaluó el crecimiento de bacterias en los riñones y se midieron los niveles séricos de IL-6 y de IgG total. La sinovitis y la destrucción ósea se estudiaron histológicamente en las articulaciones de las patas delanteras y traseras.

Experimento 2 Los ratones se infectaron con $5,0 \times 10^6$ ufc, $6,0 \times 10^6$ ufc o $4,3 \times 10^6$ ufc de la cepa *S.aureus* Newman, mutante *clfAPYI* o Newman *clfA::Erm^R* (mutante nulo *clfA*), respectivamente. Se hizo un seguimiento de la artritis clínica y el cambio de peso hasta el día 7. Los ratones se sacrificaron el día 7, se evaluó el crecimiento de bacterias en los riñones y se midieron los niveles séricos de IL-6 y de IgG total. La sinovitis y la destrucción ósea se estudiaron histológicamente en las articulaciones de las patas delanteras y traseras.

Experimento 3 Se infectaron ratones con $4,7 \times 10^6$ ufc, $3,2 \times 10^6$ ufc, $3,9 \times 10^6$ ufc o $4,8 \times 10^6$ ufc de la cepa *S.aureus* Newman, mutante *clfAPYI*, Newman mutante *clfAPYII* o Newman mutante nulo *clfA*, respectivamente. Se hizo un seguimiento de la artritis clínica y el cambio de peso hasta el día 7. Los ratones se sacrificaron el día 8 y se evaluó el crecimiento de bacterias en los riñones.

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

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

35

En el Experimento 5, los ratones se infectaron con $9,4 \times 10^6$ ufc, $7,9 \times 10^6$ ufc, $10,7 \times 10^6$ ufc o $9,8 \times 10^6$ ufc de la cepa *S.aureus* LS-1, LS-1 mutante *clfAPYI*, LS-1 mutante *clfAPYII*, o LS-1 mutante nulo *clfA*, respectivamente. Se hizo un seguimiento de la mortalidad, la artritis clínica y el cambio de peso hasta el día 16.

Inyección intraarticular de bacterias

En una articulación de rodilla por ratón se inyectó $2,4 \times 10^4$ ufc, $2,4 \times 10^4$ ufc, o $3,4 \times 10^4$ ufc de la cepa Newman de tipo silvestre, mutante *clfAPYI* o mutante desactivado *clfA*, respectivamente, en 20 μ l de PBS. N = 10 por grupo. Los ratones se sacrificaron 3 días más tarde, y las articulaciones de la rodilla se recogieron para el examen histopatológico.

45

Vacunación con ClfA recombinante de tipo silvestre y mutante

Se disolvieron rClfA40-559 purificado, rClfAPY40-559 (es decir, rClfAPYI) o BSA en una solución salina fisiológica y se emulsionaron 1:1 en adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories). Se inyectaron doscientos μ l de la emulsión que contenía 30 μ g (= 0,53 nmol) de proteína por vía subcutánea (sc) el día 0. La primera inmunización de refuerzo con 30 μ g de proteína en solución salina fisiológica en adyuvante incompleto de Freund se realizó el día 11. La segunda inmunización de refuerzo se hizo el día 21. El día 30 se extrajo la sangre a los ratones y se congelaron los sueros para un análisis posterior de las respuestas a anticuerpos.

55

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

60

Evaluación clínica de ratones infectados

La evaluación clínica se realizó de una manera ciega. Cada miembro fue inspeccionado visualmente. La inspección produjo una puntuación de 0 a 3 (0, sin hinchazón ni eritema; 1, hinchazón y/o eritema leve; 2, hinchazón y/o eritema moderado; 3, hinchazón y/o eritema pronunciado). El índice artrítico se construyó añadiendo las puntuaciones de las cuatro extremidades de un animal. El estado general de cada ratón también se examinó evaluando los signos de inflamación sistémica, es decir, disminución de peso, disminución de la vigilancia y pelaje erizado. En los casos de infección sistémica grave, cuando se determinó que un ratón estaba demasiado enfermo para sobrevivir 24 h más, se sacrificó por dislocación cervical y se consideró muerto debido a la sepsis.

Examen histológico

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

Examen bacteriológico de riñones infectados

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

Medición de IgG en suero

Los niveles en suero de IgG total se midieron mediante la técnica de inmunodifusión radial (19). Se adquirieron estándares de IgG de cabra anti-ratón y de IgG de ratón en Southern Biotech, Birmingham, AL.

Anticuerpos específicos - ELISA

Se obtuvieron muestras en suero de ratones inmunizados 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo. La respuesta a anticuerpos específica en suero contra rClfA y rClfAPY se midió mediante ELISA. Las microplacas (96 pocillos, Nunc) se recubrieron con 5 µg/ml de proteína recombinante en PBS. El agente bloqueante, las muestras en suero, los anticuerpos biotinilados y la ExtrAvidina-proxidasa se diluyeron en PBS. El ensayo se realizó de acuerdo con una descripción anterior (8). Todas las muestras en suero se diluyeron 1:20000, y la respuesta a anticuerpos se supervisó según una absorbancia a 405 nm.

En una segunda realización, para obtener una medida más precisa de las respuestas a anticuerpo específicas en los diferentes grupos de inmunización, se determinaron las respuestas en varias diluciones en suero. Por lo tanto, todas las muestras de suero se diluyeron 1:5000, 1:20000, 1:80000 y 1:320000, y la respuesta a anticuerpos se supervisó según una absorbancia a 405 nm.

Análisis de IL-6 - Se detectó IL-6 en suero mediante un procedimiento descrito previamente (20).

Análisis estadístico

La evaluación estadística se realizó utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró que $P < 0,05$ era significativo. Los datos se ponen en conocimiento como medianas, intervalos intercuartiles e intervalos centrales al 80 %, a menos que se indique otra cosa.

RESULTADOS**El intercambio de aminoácidos necesarios para la unión de ClfA al fibrinógeno dificulta el desarrollo de artritis séptica y sepsis**

Se alteraron los aminoácidos (D321, P336 y/o Y338) que se sabe que son necesarios para la unión al fibrinógeno por ClfA mediante intercambio alélico para crear mutantes de las cepas Newman y LS1 que expresen una proteína de ClfA que no se una al fibrinógeno en la superficie celular. El nivel de expresión e integridad de la proteína se midió mediante transferencia Western, que estableció que había una buena expresión de las proteínas mutantes en la superficie bacteriana y la proteína expresada era del tamaño correcto.

Se investigó la capacidad de Newman de tipo silvestre y Newman *clfA* D₃₂₁Y, P₃₃₆S Y₃₃₈A (*clfAPYI*) para provocar

artritis séptica. Se indujo artritis séptica mediante inoculación intravenosa de $3,5 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ unidades formadoras de colonias (ufc) y $3,2 \times 10^6$ a $6,0 \times 10^6$ ufc de Newman de tipo silvestre y el mutante *clfAPYI*, respectivamente. El desarrollo de la artritis se estudió clínicamente durante 7 días. El mutante *clfAPYI* provocó significativamente menos artritis grave que la cepa de tipo silvestre durante todo el periodo experimental ($P > 0,001$, figura 1 A). La frecuencia de artritis fue inferior para Newman *clfAPYI* en la mayor parte de los puntos temporales (figura 6).

De forma inesperada, parece que la nueva composición de aminoácidos en la molécula ClfAPYI se adapta a la interacción con una defensa anti-bacteriana huésped. Para comprobar esta posibilidad, se hizo una nueva construcción donde se sustituyeron P336 e Y338 (*clfA* P₃₃₆A Y₃₃₈S: *clfAPYII*) por diferentes aminoácidos. A los ratones que se les inocularon $3,9 \times 10^6$ ufc de Newman *clfAPYII* desarrollaron artritis en la misma escasa medida que el mutante *clfAPYI* (figura 1 A), y con una frecuencia similar (figura 6). Este resultado sugiere claramente que la pérdida de unión al fibrinógeno es responsable del nivel reducido de artritis.

Es posible que ClfA esté implicado en el desarrollo de la artritis por mecanismos que no implican la unión al fibrinógeno. Para probar esto, un mutante de delección ClfA que carecía de la proteína ClfA se comparó con los mutantes que expresaban la proteína modificada de ClfA que no se unía al fibrinógeno. Sin embargo, los ratones que se infectaron con $4,3 \times 10^6$ a $4,8 \times 10^6$ ufc del mutante nulo *clfA* desarrollaron artritis de una manera no diferente de los ratones infectados con los mutantes *clfAPYI* y *clfAPYII* (figura 1 A). La frecuencia de la artritis también era indistinguible (figura 6).

Las articulaciones infectadas también se investigaron histológicamente. La sinovitis en ratones infectados con Newman *clfAPYI* era significativamente más leve que en los ratones infectados de tipo silvestre tanto en el experimento 1 como 2 ($P = 0,02$ y $0,001$, respectivamente). La destrucción ósea, una causa principal de secuelas en la artritis séptica humana, estuvo casi ausente en las muestras infectadas con Newman *clfAPYI* (Experimento 2, $P = 0,001$). La sinovitis y la destrucción ósea inducida por el mutante nulo Newman *clfA* eran también menos pronunciadas en comparación con los ratones infectados con Newman de tipo silvestre ($P = 0,003$ y $0,006$, respectivamente), pero algo más graves que en el grupo Newman *clfAPYI*, aunque no significativamente.

A continuación, se analizaron las consecuencias metabólicas de las mutaciones *clfA* para el proceso infeccioso. Los ratones infectados con la cepa de tipo silvestre Newman perdieron hasta aproximadamente el 30 % de su peso corporal durante el periodo experimental. Los ratones que se infectaron con los mutantes deficientes en unión al fibrinógeno Newman *clfAPYI* y Newman *clfAPYII* apenas perdieron peso en absoluto ($P > 0,0001$ frente a tipo silvestre). Por el contrario, el mutante nulo Newman *clfA* tuvo un efecto intermedio sobre la pérdida de peso, causando significativamente menos que la cepa de tipo silvestre, pero significativamente más que las cepas mutantes *clfAPYI* y *clfAPYII* ($P \leq 0,02$ en la mayor parte de los casos, figura 1 B).

Se analizaron los niveles séricos de IL-6, una medida de la respuesta inflamatoria sistémica, el día 7-8 de la infección. El patrón de la expresión de IL-6 fue similar a los cambios de peso. Newman de tipo silvestre provocó altos niveles de IL-6 en suero ($4,8$ ($2,8$, $5,7$) ng/ml), el mutante Newman *clfAPYI* provocó considerablemente menos IL-6 ($0,2$ ($0,07$, $2,4$) ng/ml, $P < 0,0001$), mientras que el mutante nulo Newman *clfA* dio lugar a una respuesta intermedia ($2,5$ ($1,3$, $3,2$) ng/ml) con diferencias significativas tanto para el grupo de tipo silvestre como el mutante *clfAPYI* ($P = 0,009$ y $P = 0,008$, respectivamente) (media, intervalo intercuartil).

El crecimiento de bacterias en los riñones fue significativamente mayor en los ratones infectados con Newman de tipo silvestre, en comparación con ambos de los mutantes Newman *clfAPYI* como el mutante nulo Newman *clfA* ($P < 0,0001$, $P = 0,011$, y $P = 0,005$, respectivamente; figura 2). Los ratones infectados con el mutante nulo Newman *clfA* tuvieron significativamente más crecimiento bacteriano en los riñones que los ratones infectados con Newman *clfAPYI* ($P = 0,0005$, figura 2).

La IgG total en sueros se midió en los ratones el día 7-8 de la infección. Hubo un aumento significativamente menor de los niveles de IgG tanto en los grupos infectados con mutante Newman *clfAPYI* como el mutante nulo Newman *clfA* en comparación con los ratones infectados con la cepa de tipo silvestre ($3,1$ ($1,2$, $4,9$); $2,3$ ($1,0$, $2,6$); y $6,4$ ($5,0$, $11,0$), respectivamente (mediana, intervalo intercuartil); $P \leq 0,0003$). No hubo diferencias significativas entre los dos grupos mutantes.

La mortalidad fue del 17 % en los ratones infectados con Newman de tipo silvestre, del 0 % en los grupos de mutantes Newman *clfAPYI* y *clfAPYII*, y del 30 % en el grupo de mutante nulo Newman *clfA*. Hubo diferencias significativas en la mortalidad entre los grupos de tipo silvestre y *clfAPYI*, y entre los grupos del mutante *clfAPYI* y el mutante nulo *clfA* ($P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente).

Parece que los signos directos e indirectos de inflamación sistémica son más bajos en ratones infectados con *S.aureus* que expresan ClfA que es deficiente en la unión al fibrinógeno. De forma inesperada, la cepa que carecía de expresión de ClfA indujo por completo más inflamación sistémica que una cepa de expresión del mutante ClfAPY.

5

La sepsis se indujo en los ratones aumentando la dosis de inoculación de *S. aureus*. Los ratones se infectaron con $5,2 \times 10^7$ ufc de Newman de tipo silvestre, $5,1 \times 10^7$ ufc del mutante Newman *clfAPYI* y $3,3 \times 10^7$ ufc del mutante nulo Newman *clfA*. En 5 días, todos los ratones infectados con el tipo silvestre murieron, pero solo un ratón del mutante *clfAPYI* de cada diez murió después de 10 días de la infección ($P < 0,0001$, figura 3). Los ratones infectados con el mutante nulo *clfA* también sobrevivieron un tiempo significativamente más corto que los ratones infectados con el mutante *clfAPYI* ($P < 0,0001$, figura 3). En este experimento, los ratones estimulados con el mutante nulo *clfA* desarrollaron significativamente más artritis que el grupo de mutante *clfAPYI*, mientras que al mismo tiempo, perdieron significativamente más peso (figura 7 y 8). Por lo tanto, por analogía con las medidas de la inflamación sistémica en los experimentos de artritis séptica, la supervivencia de los ratones se prolonga si se expresa la molécula de ClfA, siempre que carezca de propiedades de unión al fibrinógeno.

15

Inyección de bacterias en las articulaciones

Para probar si la reacción inflamatoria en la articulación es dependiente de la unión al fibrinógeno, se inyectaron Newman de tipo silvestre, Newman *clfAPYI* o Newman *clfA* nulo directamente en una articulación de la rodilla de los ratones, pasando así al compartimento sistémico. La sinovitis, incluyendo la infiltración polimorfonuclear de la cavidad articular, y la destrucción ósea se estudiaron por histología 3 días después. Los ratones recibieron $2,4 \times 10^4$ ufc de tipo silvestre, $2,4 \times 10^4$ ufc del mutante nulo *clfA*, o $3,4 \times 10^4$ ufc del mutante *clfAPYI* en una rodilla. La sinovitis y el índice histológico de infiltración polimorfonuclear en la cavidad articular fue de 0,25 (0, 3,0) para las rodillas infectadas con tipo silvestre, 2,38 (0,25, 3,0) para el mutante nulo *clfA* y 0,25 (0, 0,25) para el mutante *clfAPYI* (media, intervalo intercuartil). El índice histológico para la destrucción del hueso fue de 0 (0, 1,0) para el tipo silvestre, 1,0 (0, 1,0) para el mutante nulo *clfA*, y 0 (0, 0) para el mutante *clfAPYI* (media, intervalo intercuartil; $P = 0,01$ entre el mutante *clfAPYI* y el mutante nulo *clfA*). Dado que el mutante *clfAPYI* provocó muy poca sinovitis y destrucción, a pesar de que se administró el 42 % más de esa cepa a los ratones que las otras cepas, se concluye que la unión al fibrinógeno promovida por ClfA es necesaria para la respuesta inflamatoria máxima dentro de la articulación. De nuevo, la ausencia de expresión de ClfA mejoró la inflamación en comparación con el mutante ClfA con deficiente unión al fibrinógeno.

Mutación PY en la cepa LS-1

35

Para determinar si la capacidad de ClfA para unirse a fibrinógeno afecta a la virulencia de otras cepas de *S.aureus*, las mutaciones *clfAPYI*, *clfAPYII* y la mutación nula *clfA* se transdujeron en la cepa de *S. aureus* de expresión de TSST-1 LS-1. Los ratones se sometieron a una prueba de provocación con $9,4 \times 10^6$ ufc de LS-1 de tipo silvestre, $7,9 \times 10^6$ ufc de LS-1 *clfAPYI*, $10,7 \times 10^6$ ufc de LS-1 *clfAPYII*, o $9,4 \times 10^6$ ufc del mutante nulo LS-1 *clfA*. La sepsis se estudió siguiendo la tasa de supervivencia. Después de 16 días, solo el 40 % de los ratones sometidos a prueba de provocación con la cepa de tipo silvestre estaban vivos, mientras que el 90 % de los ratones sometidos a prueba de provocación con los grupos de mutante *clfAPYI* y mutante nulo *clfA* y el 80 % de los ratones infectados con el mutante *clfAPYII* estaban vivos (figura 4). Los mutantes *clfAPYI* y el mutante nulo *clfA* de LS-1 eran significativamente menos virulentos ($P = 0,014$, $P = 0,05$ y $P = 0,03$, respectivamente).

45

Inmunización con proteínas ClfA recombinantes

Se estudió el efecto de la vacunación con la proteína del dominio ClfA A recombinante de tipo silvestre (rClfA) y la proteína ClfAPYI mutante (rClfAPY) tanto en el modelo de artritis séptica como en el modelo de sepsis. Los ratones se sensibilizaron y luego se reforzaron dos veces con la proteína de control BSA, rClfA o rClfAPY, y posteriormente se infectaron con $4,0 \times 10^6$ ufc de la cepa de *S. aureus* Newman para inducir artritis séptica, o con $2,3 \times 10^7$ ufc de la cepa Newman para inducir sepsis. La inmunización con rClfAPY (es decir, el dominio de la proteína A ClfAPYI recombinante) protegió significativamente contra la muerte séptica en comparación con los ratones control ($P = 0,01$, figura 5), mientras que la inmunización con rClfA no logró una protección significativa. Un día antes de la infección bacteriana hubo una respuesta a anticuerpos en suero específica mucho más alta tanto para rClfAPY como rClfA en ratones inmunizados con rClfAPY ($A_{405} = 0,39$ (0,33, 0,56) y 0,71 (0,52, 0,81) en comparación con ratones inmunizados con rClfA ($A_{405} = 0,13$ (0,07, 0,17) y 0,15 (0,10, 0,24), $P < 0,0001$ en ambas comparaciones (mediana, intervalo intercuartil)). Los animales inmunizados de control tenían solo niveles de fondo ($A_{405 \text{ nm}} = 0$ y 0,01 (0, 0,01) (mediana, intervalo intercuartil)). Los ratones inmunizados que debían ser infectados con la dosis bacteriana artrítica inferior tenían respuestas a anticuerpos similares a rClfA y rClfAPY como los ratones en los que se indujo la sepsis

60

(datos no mostrados). La inmunización tanto con rClfA como con rClfAPY protegió contra el desarrollo de la artritis, aunque la protección no fue significativa (figura 9).

5 Durante el día 5 a 9 después de la infección, la pérdida de peso se redujo significativamente en los ratones inmunizados con rClfAPY y rClfA, en comparación con los ratones control (datos no mostrados).

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

10

Para obtener una medida más precisa de las respuestas a anticuerpo específicas en los diferentes grupos de inmunización, se determinaron las respuestas en varias diluciones en suero (la segunda realización). Los datos muestran que eran muy probables valores más altos de anticuerpos específicos en sueros de ratones inmunizados con rClfAPY con respecto a los antígenos de tipo silvestre rClfAPY y rClfA, tanto en los ratones que se iban a infectar con la dosis bacteriana séptica y artrítica, respectivamente, como en los sueros de ratones inmunizados con rClfA de tipo silvestre, puesto que hubo respuestas a anticuerpos significativamente más altas medidas como la absorbancia en ratones inmunizados con rClfAPY en cada dilución en suero en todas las comparaciones (P <0,0001 a P = 0,008, figura 12-15). La inmunización con BSA provocó solo una respuesta a anticuerpos de fondo.

15

20 **CONCLUSIÓN**

Los resultados sugieren claramente que la interacción ClfA-fibrinógeno es crucial para la virulencia bacteriana y el desenlace de la enfermedad. La capacidad de ClfA de unirse al fibrinógeno se asoció a una mayor virulencia en cuanto a la capacidad de causar muerte séptica. En ambas cepas estafilocócicas ensayadas, un mutante *clfAPY* indujo menos muerte séptica que el tipo silvestre. Además, la gravedad de la artritis se redujo en gran medida en ratones infectados con el mutante *clfAPY* de no unión al fibrinógeno.

25

Un mecanismo probable para la promoción de la virulencia por la interacción fibrinógeno-superficie celular bacteriana es la inhibición de la fagocitosis de los neutrófilos (5). Los neutrófilos son cruciales para la defensa del huésped en la fase temprana de la infección por *S. aureus* (13). Sin neutrófilos, el crecimiento bacteriano aumenta de manera pronunciada en la sangre y los riñones, y la frecuencia de la artritis y la mortalidad aumenta. La inhibición mediada por el fibrinógeno de la fagocitosis de neutrófilos por ClfA podría explicar, al menos en parte, la virulencia más pronunciada de *S. aureus* de tipo silvestre en comparación con los mutantes *clfAPY*. La unión del fibrinógeno a ClfA podría disminuir la opsonofagocitosis por neutrófilos al reducir la deposición de opsonina o el acceso a las opsoninas por los receptores de neutrófilos. Como alternativa, el fibrinógeno unido podría bloquear la unión de un factor huésped protector desconocido a *S. aureus*. Otra opción es que la interacción fibrinógeno-ClfA promueva el paso bacteriano de los vasos sanguíneos al tejido o promueva la colonización en los tejidos.

30

35

Inesperadamente, nuestros datos también muestran que el mutante nulo ClfA era más virulento que las cepas mutantes *clfAPY*. Posiblemente, la proteína ClfA tiene funciones in vivo además de la interacción con el fibrinógeno. Esta interacción es claramente desventajosa para el huésped como se muestra en este estudio. Otras funciones de ClfA no están actualmente bien correlacionadas, pero la agregación plaquetaria no dependiente de fibrinógeno ejercida por ClfA podría dar como resultado la captura de grandes cantidades de *S. aureus* en circulación con la posterior eliminación de los complejos plaquetarios bacterianos a través del sistema reticuloendotelial. Dicha eliminación mediada por la agregación plaquetaria de estafilococos se produciría fácilmente en las cepas mutadas de tipo silvestre y de *clfAPY*, pero no en la desactivación de *clfA*. Mientras que en la cepa de tipo silvestre la interacción del fibrinógeno podría eclipsar los demás eventos, en los mutantes *clfAPY*, tal eliminación bacteriana podría ser hartamente beneficiosa para el huésped.

40

45

El mutante desactivado *clfA* protegía contra la muerte séptica en la misma medida que la mutación *clfAPY* en la cepa de *S. aureus* LS-1, pero protegía menos, en todo caso, en la cepa Newman. El impacto global de la expresión de ClfA sobre la virulencia bacteriana podría diferir entre diferentes cepas de *S. aureus* dependiendo del nivel de expresión y la presencia de otros factores de virulencia.

50

55

La cuestión de si el mutante *clfAPY* muestra igual o menor virulencia una vez en la cavidad articular es de cierta importancia teniendo en cuenta que en el líquido sinovial inflamado el fibrinógeno y la fibrina son abundantes. Los datos sugieren que el mutante *clfAPY* es menos destructivo para el cartílago y el hueso.

El efecto protector del mutante D₃₂₁P₃₃₆Y₃₃₈ de no unión al fibrinógeno del dominio A de ClfA recombinante era mayor que para rClfA de tipo silvestre. La inmunización con ClfAPY indujo muy probablemente una mejor respuesta

60

inmune ya que se provocaron respuestas a anticuerpos específicos más altas frente tanto al inmunógeno como a la proteína ClfA de tipo silvestre. Más importante aún, indujo una mayor respuesta inmune protectora frente a la muerte séptica que ClfA de tipo silvestre.

- 5 En conclusión, estos resultados muestran que rClfAPY es una mejor vacuna candidata que ClfA recombinante de tipo silvestre. Se cree que la unión de fibrinógeno por medio de la proteína ClfA de tipo silvestre durante la fase de inmunización disminuye la presentación de antígenos debido a la ocultación de importantes epítomos en la molécula de ClfA y, por lo tanto, altera la producción de anticuerpos específicos.

10 **Ejemplo 2**

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

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS:

15

Se siguieron los protocolos descritos en el Ejemplo 1 en este ejemplo, que utilizaron

- rClfA 221-559 (es decir, truncamiento de la región A de ClfA que comprende N2 y N3 correspondiente a los aminoácidos 220-559)
- 20 • rClfAPYI221-559; y
- BSA.

Había 15 ratones NMRI hembra por grupo de 8 semanas de edad al inicio de los experimentos. En este Ejemplo, las construcciones utilizadas para la inmunización fueron truncamiento de ClfA de tipo silvestre/N2N3 nativo, 25 truncamiento de ClfA N2N3 con la mutación PYI como se define en el Ejemplo 1. Se usó BSA como control.

Vacunación con ClfA recombinante de tipo silvestre y mutante

Los ratones se inmunizaron con rClfA 221-559, rClfAPYI 221-559 o BSA de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 1.

30

El rClf A221-559 purificado, rClfAPYI221-559 (es decir, los sub-dominios N2 y N3 de la proteína A recombinante ClfAPYI) o BSA se disolvieron en PBS y se emulsionaron 1:1 en adyuvante completo de Freund. Se inyectaron s.c. doscientos µl de la emulsión que contenía 30 µg (= 0,79 nmol) de proteína el día 0. La primera inmunización de refuerzo con 30 µg de proteína en solución salina fisiológica en adyuvante incompleto de Freund se realizó el día 12.

35 La segunda inmunización de refuerzo se hizo el día 22. El día 31 se extrajeron las muestras de sangre a los ratones y se congelaron los sueros para un análisis posterior de las respuestas a anticuerpos.

Anticuerpos específicos - ELISA

40 Se obtuvieron muestras en suero de ratones inmunizados 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo. La respuesta a anticuerpos específica en suero contra rClfA221-559 y rClfAPYI221-559 se midió mediante ELISA. Las microplacas (96 pocillos, Nunc) se recubrieron con 5 µg/ml de proteína recombinante en PBS. El agente bloqueante, las muestras en suero, los anticuerpos biotinilados y la ExtrAvidina-proxidasa se diluyeron en PBS. El análisis se realizó de acuerdo con una descripción anterior (8). Todas las muestras de suero se diluyeron 1:5000, 45 1:20000, 1:80000 y 1:320000, y la respuesta a anticuerpos se supervisó según una absorbancia a 405 nm.

RESULTADOS:

RESPUESTA A ANTICUERPOS ESPECÍFICA:

50

La respuesta a anticuerpos se midió por la absorbancia en un análisis ELISA, según el Ejemplo 1, con cuatro diluciones en suero diferentes. Los datos obtenidos fueron muy similares a los datos del Ejemplo 1.

Se encontró que la inmunización con rClfAPYI221-559 muy probablemente dio lugar a títulos más altos de anticuerpos específicos tanto para rClfA221-559 nativo como rClfAPYI221-559, en comparación con la inmunización rClfA221-559 nativa, ya que había respuestas a anticuerpos significativamente más altas medidas como la absorbancia en ratones inmunizados con rClfAPYI221-559 en cada dilución en suero en todas las comparaciones, excepto una (P = 0,001 a 0,025, véanse las figuras 16 y 17). La inmunización con BSA provocó solo los niveles de fondo de la respuesta a anticuerpos.

60

CONCLUSIÓN

Se encontró que la inmunización con una proteína rClfAPYI221-559 dio lugar a respuestas a anticuerpos significativamente más altas tanto para el inmunógeno como para la proteína ClfA de tipo silvestre, que la inmunización con la proteína nativa.

En base a estos hallazgos, se concluye que la inmunización con DPY, independientemente de si la proteína DPY comprende los aminoácidos 40 a 550 como en el Ejemplo 1 o los aminoácidos 221 a 559 como en el Ejemplo 2, induce una mejor respuesta inmune que la inmunización con ClfA nativo del tamaño correspondiente.

Ejemplo 3

Truncamiento de la región A de ClfA (truncamiento de retención δ /delta)

15 MATERIALES Y PROCEDIMIENTO:

Se siguieron los protocolos descritos en el Ejemplo 1 en este ejemplo, que utilizaron la siguiente construcción:

- rClfA 221-531 (es decir, truncamiento de la región A de rClfA que comprendía los aminoácidos N2 y N3 220-559 pero sin los aminoácidos peptídicos de retención 532-538 y los posteriores residuos ricos en prolina.

Había 15 ratones NMRI hembra en el grupo de 8 semanas de edad al inicio del experimento. En este Ejemplo, se usó la construcción anterior para la inmunización. Los ratones se inmunizaron con el truncamiento anterior de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 1.

Vacunación con ClfA recombinante de tipo silvestre y mutante

Se disolvió rClfA221-531 purificado en PBS y se emulsificó 1:1 en adyuvante completo de Freund. Se inyectaron s.c. doscientos μ l de la emulsión que contenía 0,79 nmol de proteína el día 0. La primera inmunización de refuerzo con 0,79 nmol de proteína en solución salina fisiológica en adyuvante incompleto de Freund se realizó el día 12. La segunda inmunización de refuerzo se hizo el día 22. El día 31 se extrajo la sangre a los ratones y se congelaron los sueros para un análisis posterior de las respuestas a anticuerpos.

Anticuerpos específicos - ELISA

Se obtuvieron muestras en suero de ratones inmunizados 9 días después de la segunda inmunización de refuerzo. Los niveles en suero de los anticuerpos específicos se midieron por ELISA. Las microplacas (96 pocillos; Nunc) se recubrieron con 4,6 μ g/ml de proteína rClfA221-531 que era equimolar a 5 μ g/ml de rClfA221-559 y rClfAPYI221-559 de los Ejemplos 1 y 2. El agente bloqueante, las muestras en suero, los anticuerpos biotinilados y la ExtrAvidina-proxidasa se diluyeron en PBS. El análisis se realizó de acuerdo con una descripción anterior (8). Todas las muestras de suero se diluyeron 1:5000, 1:20000, 1:80000 y 1:320000, y la respuesta a anticuerpos se controló según una absorbancia a 405 nm.

RESULTADOS:

La respuesta a anticuerpos se midió por la absorbancia en un análisis ELISA, según el Ejemplo 1. Se encontró que la inmunización con ClfA221-531 dio lugar a una respuesta inmune, medida como una respuesta a anticuerpos específica (figura 18).

50 CONCLUSIÓN:

Se encontró que el fragmento rClfA221-531 también funciona bien como un inmunógeno, ya que el antígeno provoca una respuesta a anticuerpo específica.

55 EJEMPLO 4 - Purificación de proteínas

Proteínas ClfA ensayadas y protocolo

- ClfA de tipo silvestre de longitud completa
- ClfA D₃₂₁YP₃₃₆SY₃₃₈A (mutante triple) (es decir, clfAPYI 40-559) (SEQ ID NO 4)

- ClfAPYI sin la sustitución D₃₂₁Y (es decir, ClfAP₃₃₆SY₃₃₈A)

Las proteínas recombinantes marcadas con his descritas anteriormente se purificaron mediante cromatografía de afinidad de quelato de níquel inmovilizada. La expresión se indujo por la adición de IPTG 1 mM a células con crecimiento exponencial. Después de 3 h de inducción, las células se recolectaron por centrifugación y se suspendieron de nuevo en 30 ml de tampón de unión (NaCl 0,5 M, Tris-HCl 20 mM, imidazol 20 mM, pH 7,9) que contenía inhibidores de proteasa (sin EDTA completa, Roche). Las células se lisaron en una célula de presión de French y el lisado se eliminó por centrifugación a alta velocidad seguido por filtración. Se cargó una columna HiTrap Chelating HP (GE Healthcare) con Ni²⁺ 150 mM y se equilibró con tampón de unión. El lisado aclarado se aplicó a la columna y después se lavó la columna con tampón de unión. La proteína unida se eluyó con un gradiente lineal continuo de imidazol (5 - 100 mM) en NaCl 0,5 M, Tris - HCl 20 mM (pH 7,9).

Las muestras se analizaron por SDS-PAGE (mostrado en las figuras 21A y 21B) y las fracciones que contenían la proteína del peso molecular correcto se agruparon y se dializaron contra PBS durante 16 h a 4 °C. Después de la diálisis, las proteínas se analizaron por SDS-PAGE para evaluar la integridad (figura 21C).

Resultados

Los resultados se muestran en la figura 21, donde

A. Purificación de ClfA wt (1) y el mutante triple (2). Las proteínas son puras y no se aprecia descomposición.

B. Purificación de ClfAPYI sin la sustitución D₃₂₁Y. Se aprecia la descomposición del producto proteico.

C. Tras diálisis durante una noche a 4 °C, 10 µl de mutante triple (1) o ClfAPYI sin la sustitución D₃₂₁Y (2) (10 µM).

Esta figura muestra que el mutante triple (1) no se descompone.

Conclusión

Observando la descomposición de las proteínas durante la purificación, se encontró que el ClfA D₃₂₁YP₃₃₆SY₃₃₈A (mutante triple) proporciona una proteína más estable que el ClfAPYI sin la sustitución D₃₂₁Y (es decir, ClfAP₃₃₆SY₃₃₈A). Por lo tanto, estos resultados muestran que la proteína del ClfA D₃₂₁YP₃₃₆SY₃₃₈A (mutante triple) es más fácil de purificar cuando está presente la mutación D₃₂₁. Por lo tanto, la presencia de la mutación D321 conduce a una proteína con mayor estabilidad.

REFERENCIAS

1. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O'Neill G, Day NPJ (2002) Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 70:4987-4996.
2. McDevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, Bell E, Turner N, McEntire L, Foster T, Höök M (1997) Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *Eur J Biochem* 247:416-424.
3. McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ (1994) Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 11:237-248.
4. Palmqvist N, Patti JM, Tarkowski A, Josefsson E (2004) Expression of staphylococcal clumping factor A impedes macrophage phagocytosis. *Microb Infect* 6:188-195.
5. Higgins J, Loughman A, van Kessel KPM, van Strijp JAG, Foster TJ (2006) Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *FEMS Microbiol Lett* 258:290-296.
6. Loughman A, Fitzgerald JR, Brennan MP, Higgins J, Downer R, Cox D, Foster TJ (2005) Roles of fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by *Staphylococcus aureus* clumping factor A. *Mol Microbiol* 57:804-818.
7. O'Brien L, Kerrigan SW, Kaw G., Hogan M., Penadés J., Litt D., Fitzgerald D.J., Foster T.J. & Cox D. (2002) Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Mol Microbiol* 44, 1033-1044.
8. Josefsson E., Hartford O., O'Brien L, Patti JM, Foster T (2001) Protection against experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. *J Infect Dis* 184:1572-1580.
9. Palmqvist N, Foster T, Fitzgerald R, Josefsson E, Tarkowski A (2005) Fibronectin-binding proteins and fibrinogen-binding clumping factors play distinct roles in staphylococcal arthritis and systemic inflammation. *J Inf Dis* 191:791-798.
10. Deivanayagam CCS, Wann ER, Chen W, Carson M, Rajashankar KR, Höök M, Narayana SVL (2002) A novel

variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of *Staphylococcus aureus*: crystal structure of the fibrinogen-binding MSCRAMM, clumping factor A. *The EMBO Journal* 21:6660-6672.

11. Bremell T, Lange S, Yacoub A, Ryden C, Tarkowski A (1991) Experimental *Staphylococcus aureus* arthritis in mice. *Infect Immun* 59:2615-2623.
- 5 12. Sakiniene E, Bremell T, Tarkowski A (1996) Addition of corticosteroids to antibiotic treatment ameliorates the course of experimental *Staphylococcus aureus* arthritis. *Arthritis Rheumatism* 39:1596-1605.
13. Verdrengh M, Tarkowski A (1997) Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 65:2517-2521.
14. Duthie ES, Lorenz LL (1952) *Staphylococcal* coagulase: mode of action and antigenicity. *J Gen Microbiol* 6:95-10 107.
15. Kreiswirth BN, Löfdahl S, Betley MJ, O'Reilly M, Schlievert PM, Bergdoll MS, Novick RP (1983) The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* 305:709-712.
16. Foster TJ (1998) in *Methods in Microbiology* Vol. 27: Bacterial Pathogenesis, eds. Williams P, Ketley J, Salmond G (Academic Press, London), pp 433-454.
- 15 17. O'Connell DP, Nanavaty T, McDevitt D, Gurusiddappa S, Höök M, Foster TJ (1998) The fibrinogen-binding MSCRAMM (clumping factor) of *Staphylococcus aureus* has a Ca²⁺-dependent inhibitory site. *J Biol Chem* 273:6821-6829.
18. Sakiniene E, Bremell T, Tarkowski A (1999) Complement depletion aggravates *Staphylococcus aureus* septicaemia and septic arthritis. *Clin Exp Immunol* 115:95-102.
- 20 19. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2:235-254.
20. Bremell T, Abdelnour A, Tarkowski A (1992) Histopathological and serological progression of experimental *Staphylococcus aureus* arthritis. *Infect Immun* 60:2976-2985.

25 LISTA DE SECUENCIAS

- <110> The Provost Fellows and Scholars of the College of the Holy and Undivided Trinity of Queen Elizabeth Near Dublin
- <120> Tratamiento de infecciones microbianas
- 30 <130> 31757WO
- <150> IE 2009/0549
- <151> 2009-07-16
- <160> 11
- <170> PatentIn versión 3.3
- 35 <210> 1
- <211> 933
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 40 <220>
- <223> Secuencia de proteína de longitud completa del ClfA (tipo silvestre) recombinante
- <400> 1

ES 2 625 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 625 979 T3

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
165 170 175

Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
180 185 190

Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr
195 200 205

Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
210 215 220

Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr
225 230 235 240

Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
245 250 255

Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly
260 265 270

Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
275 280 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
290 295 300

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

Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro
325 330 335

Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu
340 345 350

Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp
355 360 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
370 375 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385 390 395 400

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

ES 2 625 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
 625 630 635 640

Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
 645 650 655

Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
 660 665 670

Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp

ES 2 625 979 T3

675	680	685
Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Asp Ser Asp Ser Asp
690	695	700
Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Asp Ser Asp Ser Asp
705	710	715
Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Asp Ser Asp Ser Asp
	725	730
Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Asp Ser Asp Ser Asp
	740	745
Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Asp Ser Ala
	755	760
Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Asp Ser Asp
	770	775
Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Asp Ser Asp
	785	790
Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Glu Ser Asp Ser Asp	Ser Glu Ser Asp
	805	810
Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Asp Ser Asp Ser Asp	Ser Asp Ser Asp
	820	825
Ser Asp Ser Asp Ser Ala	Ser Asp Ser Gly Ser Asp	Ser Asp Ser Asp
	835	840
Ser Ser Ser Asp Ser Asp	Ser Glu Ser Asp Ser Asn	Ser Asp Ser Glu
	850	855
Ser Gly Ser Asn Asn Asn	Val Val Pro Pro Asn Ser Pro	Lys Asn Gly
865	870	875
Thr Asn Ala Ser Asn Lys	Asn Glu Ala Lys Asp Ser Lys	Glu Pro Leu
	885	890
Pro Asp Thr Gly Ser Glu	Asp Glu Ala Asn Thr Ser Leu	Ile Trp Gly
	900	905
Leu Leu Ala Ser Ile Gly	Ser Leu Leu Leu Phe Arg Arg	Lys Lys Glu
	915	920
Asn Lys Asp Lys Lys		
930		

<210> 2
 <211> 1560
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

ES 2 625 979 T3

<220>

<223> Regiones del dominio del ClfA A recombinante (tipo silvestre) N1 N2 N3

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(1560)

<400> 2

agt gaa aat agt gtt acg caa tct gat agc gca agt aac gaa agc aaa	48
Ser Glu Asn Ser Val Thr Gln Ser Asp Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys	
1 5 10 15	
agt aat gat tca agt agc gtt agt gct gca cct aaa aca gac gac aca	96
Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala Ala Pro Lys Thr Asp Asp Thr	
20 25 30	
aac gtg agt gat act aaa aca tcg tca aac act aat aat ggc gaa acg	144
Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Ser Ser Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr	
35 40 45	
agt gtg gcg caa aat cca gca caa cag gaa acg aca caa tca tca tca	192
Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser	
50 55 60	
aca aat gca act acg gaa gaa acg ccg gta act ggt gaa gct act act	240
Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr	
65 70 75 80	
acg aca acg aat caa gct aat aca ccg gca aca act caa tca agc aat	288
Thr Thr Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn	
85 90 95	
aca aat gcg gag gaa tta gtg aat caa aca agt aat gaa acg act ttt	336
Thr Asn Ala Glu Leu Val Asn Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe	
100 105 110	
aat gat act aat aca gta tca tct gta aat tca cct caa aat tct aca	384
Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr	
115 120 125	
aat gcg gaa aat gtt tca aca acg caa gat act tca act gaa gca aca	432
Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr	
130 135 140	
cct tca aac aat gaa tca gct cca cag agt aca gat gca agt aat aaa	480
Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys	
145 150 155 160	
gat gta gtt aat caa gcg gtt aat aca agt gcg cct aga atg aga gca	528
Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala	
165 170 175	
ttt agt tta gcg gca gta gct gca gat gca ccg gca gct ggc aca gat	576
Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp	
180 185 190	
att acg aat cag ttg acg aat gtg aca gtt ggt att gac tct ggt acg	624

ES 2 625 979 T3

Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr	
195	205
act gtg tat ccg cac caa gca ggt tat gtc aaa ctg aat tat ggt ttt	672
Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe	
210	215
tca gtg cct aat tct gct gtt aaa ggt gac aca ttc aaa ata act gta	720
Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val	
225	230
cct aaa gaa tta aac tta aat ggt gta act tca act gct aaa gtg cca	768
Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro	
	245
cca att atg gct gga gat caa gta ttg gca aat ggt gta atc gat agt	816
Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser	
	260
gat ggt aat gtt att tat aca ttt aca gac tat gta aat act aaa gat	864
Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp	
	275
gat gta aaa gca act ttg acc atg ccc gct tat att gac cct gaa aat	912
Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn	
	290
ggt aaa aag aca ggt aat gtg aca ttg gct act ggc ata ggt agt aca	960
Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr	
	305
aca gca aac aaa aca gta tta gta gat tat gaa aaa tat ggt aag ttt	1008
Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe	
	325
tat aac tta tct att aaa ggt aca att gac caa atc gat aaa aca aat	1056
Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn	
	340
aat acg tat cgt cag aca att tat gtc aat cca agt gga gat aac gtt	1104
Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val	
	355
att gcg ccg gtt tta aca ggt aat tta aaa cca aat acg gat agt aat	1152
Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn	
	370
gca tta ata gat cag caa aat aca agt att aaa gta tat aaa gta gat	1200
Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp	
	385
aat gca gct gat tta tct gaa agt tac ttt gtg aat cca gaa aac ttt	1248
Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe	
	405
gag gat gtc act aat agt gtg aat att aca ttc cca aat cca aat caa	1296
Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln	
	420
tat aaa gta gag ttt aat acg cct gat gat caa att aca aca ccg tat	1344
Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr	
	435
ata gta gtt gtt aat ggt cat att gat ccg aat agc aaa ggt gat tta	1392
Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu	
	440

ES 2 625 979 T3

450	455	460	
gct tta cgt tca act tta tat ggg tat aac tcg aat ata att tgg cgc			1440
Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg			
465	470	475	480
tct atg tca tgg gac aac gaa gta gca ttt aat aac gga tca ggt tct			1488
Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser			
	485	490	495
ggt gac ggt atc gat aaa cca gtt gtt cct gaa caa cct gat gag cct			1536
Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro			
	500	505	510
ggt gaa att gaa cca att cca gag			1560
Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu			
	515	520	

<210> 3

<211> 520

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10 <400> 3

Ser	Glu	Asn	Ser	Val	Thr	Gln	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asn	Glu	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Asn	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ala	Ala	Pro	Lys	Thr	Asp	Asp	Thr
			20					25					30		
Asn	Val	Ser	Asp	Thr	Lys	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Asn	Asn	Gly	Glu	Thr
		35					40					45			
Ser	Val	Ala	Gln	Asn	Pro	Ala	Gln	Gln	Glu	Thr	Thr	Gln	Ser	Ser	Ser
	50					55					60				
Thr	Asn	Ala	Thr	Thr	Glu	Glu	Thr	Pro	Val	Thr	Gly	Glu	Ala	Thr	Thr
65					70					75					80
Thr	Thr	Thr	Asn	Gln	Ala	Asn	Thr	Pro	Ala	Thr	Thr	Gln	Ser	Ser	Asn
			85						90					95	
Thr	Asn	Ala	Glu	Glu	Leu	Val	Asn	Gln	Thr	Ser	Asn	Glu	Thr	Thr	Phe
			100					105					110		
Asn	Asp	Thr	Asn	Thr	Val	Ser	Ser	Val	Asn	Ser	Pro	Gln	Asn	Ser	Thr
		115					120					125			
Asn	Ala	Glu	Asn	Val	Ser	Thr	Thr	Gln	Asp	Thr	Ser	Thr	Glu	Ala	Thr
	130					135					140				

ES 2 625 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe

ES 2 625 979 T3

405 410 415

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

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

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

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

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

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

Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
515 520

<210> 4

<211> 520

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Regiones del dominio del C1fA A N1 N2 N3 con alteraciones (C1fA D321Y P336S Y338A)

10 <400> 4

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

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

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

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

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

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

ES 2 625 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 625 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
 515 520

<210> 5

<211> 520

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

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

10 <400> 5

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

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

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

ES 2 625 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 625 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
 515 520

<210> 6

<211> 530

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Región A del rClfA wt con residuos del extremo N y C adicionales

10 <400> 6

ES 2 625 979 T3

His His His His His His Gly Ser Ser Glu Asn Ser Val Thr Gln Ser
 1 5 10 15
 Asp Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30
 Ala Ala Pro Lys Thr Asp Asp Thr Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Ser
 35 40 45
 Ser Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln
 50 55 60
 Gln Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr
 65 70 75 80
 Pro Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr Thr Thr Thr Asn Gln Ala Asn Thr
 85 90 95
 Pro Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn
 100 105 110
 Gln Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Val Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr
 130 135 140
 Gln Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro
 145 150 155 160
 Gln Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn
 165 170 175
 Thr Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala
 180 185 190
 Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val
 195 200 205
 Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly
 210 215 220
 Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys
 225 230 235 240
 Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly
 245 250 255

ES 2 625 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val
 500 505 510
 Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
 515 520 525

Lys Leu
 530

ES 2 625 979 T3

<210> 7
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

5

<220>
 <223> Región de rClfAPYI A wt con residuos del extremo N y C adicionales

<400> 7

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 625 979 T3

Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val
 195 200 205
 Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly
 210 215 220
 Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys
 225 230 235 240
 Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly
 245 250 255
 Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val
 260 265 270
 Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe
 275 280 285
 Thr Tyr Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met
 290 295 300
 Ser Ala Ala Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr
 305 310 315 320
 Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val
 325 330 335
 Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr
 340 345 350
 Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr
 355 360 365
 Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn
 370 375 380
 Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr
 385 390 395 400
 Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser
 405 410 415
 Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn
 420 425 430
 Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro
 435 440 445

ES 2 625 979 T3

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

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

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

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

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

Lys Leu
530

<210> 8

<211> 530

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Región de rClfAPYII A wt con residuos del extremo N y C adicionales

10 <400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 625 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 625 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Leu
530

<210> 9

<211> 339

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Residuos de rClfA 221-559

10 <400> 9

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

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

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

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

ES 2 625 979 T3

Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile
 85 90 95
 Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala Thr
 100 105 110
 Leu Thr Met Pro Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr Gly
 115 120 125
 Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys Thr
 130 135 140
 Val Leu Val Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser Ile
 145 150 155 160
 Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln
 165 170 175
 Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val Leu
 180 185 190
 Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp Gln
 195 200 205
 Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp Leu
 210 215 220
 Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr Asn
 225 230 235 240
 Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe
 245 250 255
 Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn
 260 265 270
 Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr
 275 280 285
 Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp
 290 295 300
 Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp
 305 310 315 320
 Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro
 325 330 335

Ile Pro Glu

<210> 10

ES 2 625 979 T3

<211> 349
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

5 <220>
 <223> Residuos de rClfA 221 a 559 con residuos del extremo N y C adicionales

<400> 10

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

ES 2 625 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 321

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> residuos de rClfA de 221 a 531 con residuos en los extremos N y C adicionales (truncamiento de retención delta) - 6 residuos his N-terminales, residuos N terminales Gly y Ser, y 2 residuos C-terminales (lys/leu) obtenidos a partir del cebador en torno a los residuos aminoácidos 221 a

<400> 11

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

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

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

ES 2 625 979 T3

35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

REIVINDICACIONES

1. Un factor A de aglutinación de proteína de unión al fibrinógeno recombinante (ClfA) o fragmento del mismo que comprende al menos los residuos de aminoácidos 221 a 531 de la región de unión al fibrinógeno, con la

5 secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID n°. 1 a 3 o una secuencia aminoacídica al menos un 90 % idéntica a las SEQ ID n°. 1 a 3, donde el residuo aminoacídico D₃₂₁ está sustituido con tirosina (D₃₂₁Y) y P₃₃₆ e Y₃₃₈ está sustituido con serina o alanina para dar como resultado rClfA D₃₂₁Y P₃₃₆S Y₃₃₈A o rClfA D₃₂₁Y P₃₃₆A Y₃₃₈S y la proteína recombinante tiene capacidad reducida o carece de la capacidad de unirse no covalentemente al fibrinógeno en comparación con la proteína no mutada o fragmento de la misma, estimula una

10 mayor respuesta inmune a las infecciones por Staphylococci que la proteína ClfA de tipo silvestre.
2. El factor A de aglutinación (ClfA) de proteína de unión al fibrinógeno recombinante o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, donde la infección es una infección por Staphylococcus aureus.
- 15 3. El factor A de aglutinación (ClfA) de proteína de unión a fibrinógeno recombinante o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la infección es una sepsis, artritis séptica y/o endocarditis.
4. La proteína de unión al fibrinógeno recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1

20 a 3, que comprende un fragmento de la región de unión al fibrinógeno seleccionada de:

 - a. subregiones N123, que abarcan los residuos aminoacídicos 40 a 559 de la región de unión al fibrinógeno (Región A);
 - b. subregiones N23, que abarcan los residuos aminoacídicos 221 a 559 de la región de unión al fibrinógeno (Región

25 A);
 - y/o
 - c. una subregión N3, que abarca los residuos aminoacídicos 369 a 559 de la región de unión al fibrinógeno (Región A).
- 30 5. La proteína de unión al fibrinógeno recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID n°. 4 a 11 o una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a las SEQ ID n°. 4 a 11.
6. La proteína de unión al fibrinógeno recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1

35 a 5, donde los residuos aminoacídicos Ala254, Tyr256, Pro336, Tyr338, Ile387, Lys389, Glu526 y/o Val527 están sustituidos con uno de entre Ala o Ser.
7. La proteína de unión al fibrinógeno recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1

40 a 5 que comprende al menos una sustitución de residuos de aminoácidos en los residuos de aminoácidos Tyr256, Pro336, Tyr338, Lys389, Glu526 y/o Val527.
8. El factor A de aglutinación (ClfA) de proteína de unión a fibrinógeno recombinante o fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento o profilaxis de

45 infecciones microbianas.
9. El factor A de aglutinación (ClfA) de la proteína de unión al fibrinógeno recombinante o fragmento del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 en el tratamiento o profilaxis de infecciones por Staphylococci.
10. El factor A de aglutinación (ClfA) de la proteína de unión al fibrinógeno recombinante o fragmento del

50 mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9 en el tratamiento o profilaxis de la sepsis, artritis séptica y/o endocarditis.
11. El factor A de aglutinación (ClfA) de la proteína de unión al fibrinógeno recombinante o fragmento del mismo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde la proteína recombinante estimula una

55 mayor respuesta inmune a las infecciones por Staphylococci, incluyendo sepsis, artritis séptica y/o endocarditis, que la proteína ClfA de tipo silvestre, y tiene una mayor estabilidad en comparación con rClfA P₃₃₆S Y₃₃₈A.
12. Uso de la proteína recombinante, o fragmento de la misma, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una infección por

60 Staphylococci.

13. Una construcción de ácido nucleico, una proteína de fusión, un vector de expresión o una célula huésped que expresa la proteína recombinante, o fragmento de los mismos, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 5 14. Una vacuna que comprende la proteína recombinante, o fragmento de la misma, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
15. Un anticuerpo contra la proteína recombinante, o fragmento del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, preferentemente en forma de suero hiperinmune.
- 10 16. Una composición farmacéutica inmunógena que comprende la proteína recombinante, o fragmento de la misma, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 15 17. Un procedimiento para preparar la composición inmunógena de la reivindicación 16, que comprende la etapa de añadir el excipiente farmacéuticamente aceptable a la proteína recombinante, o fragmento del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

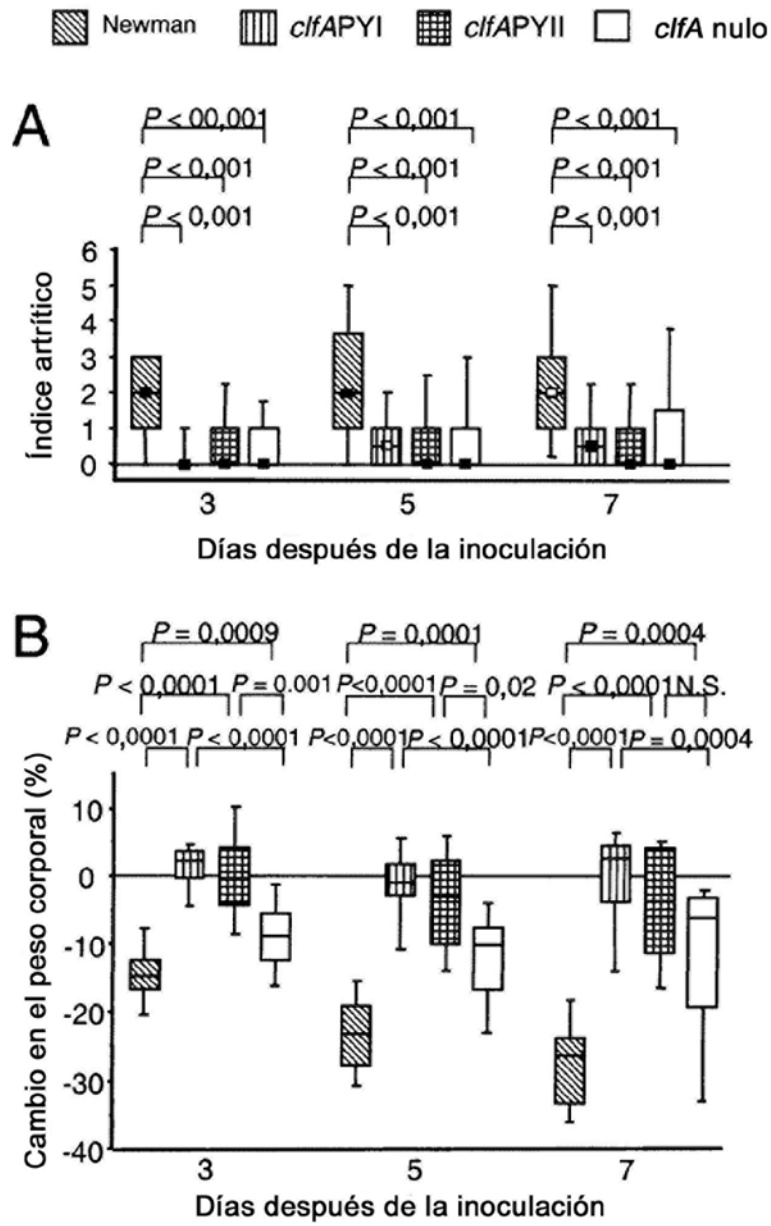


Fig. 1

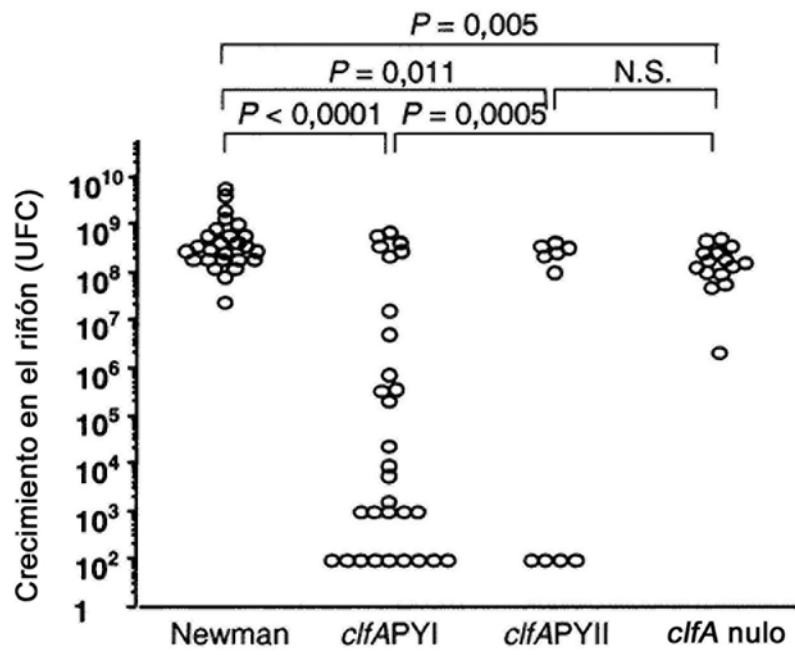


Fig. 2

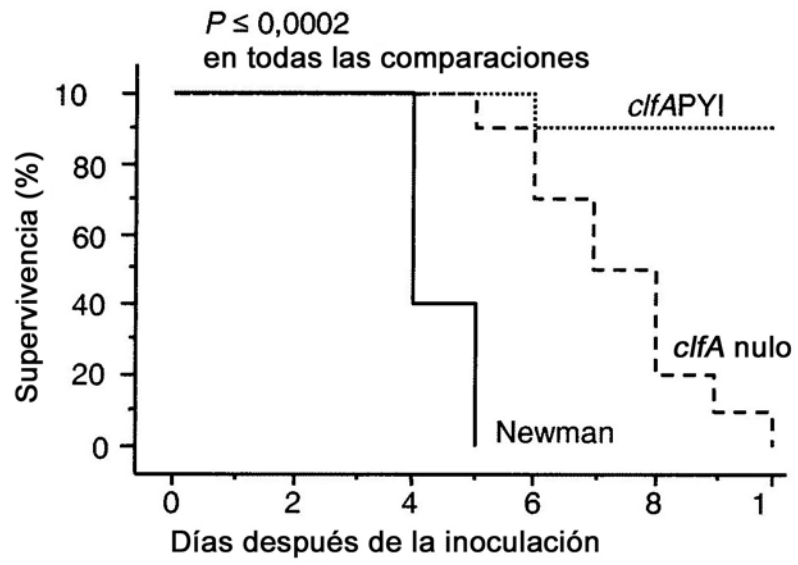


Fig. 3

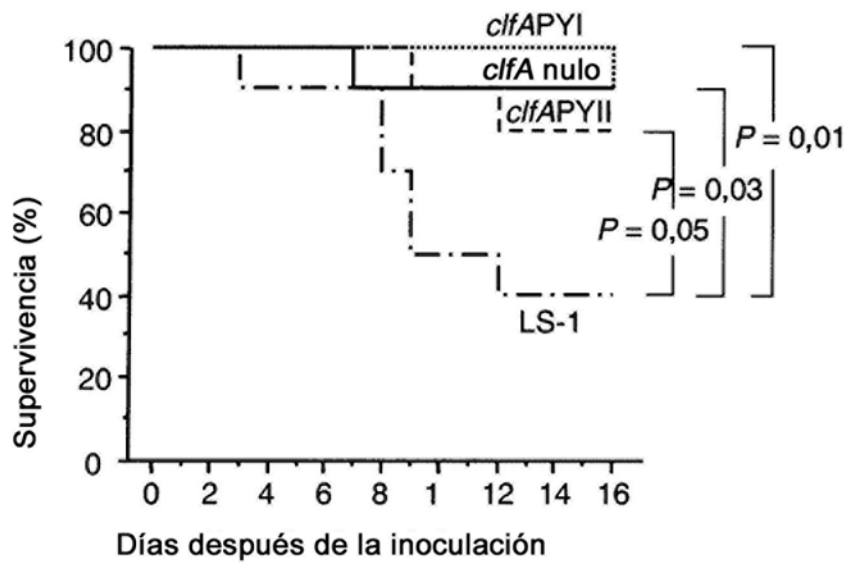


Fig. 4

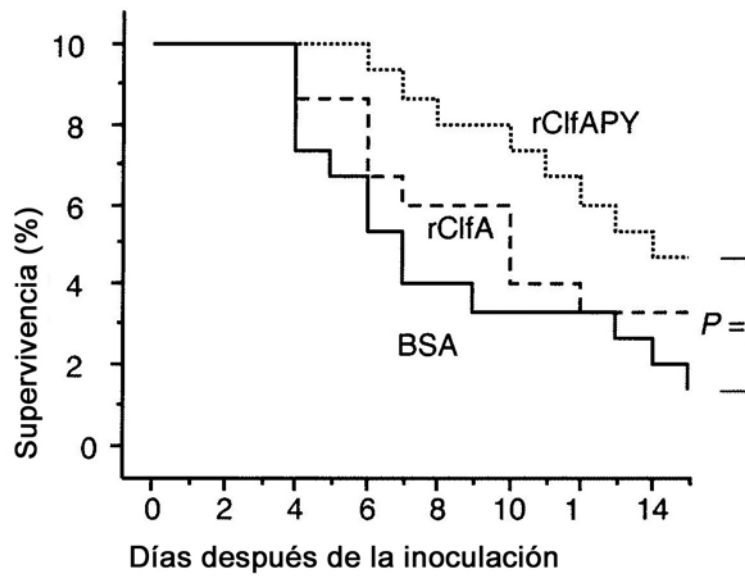


Fig. 5

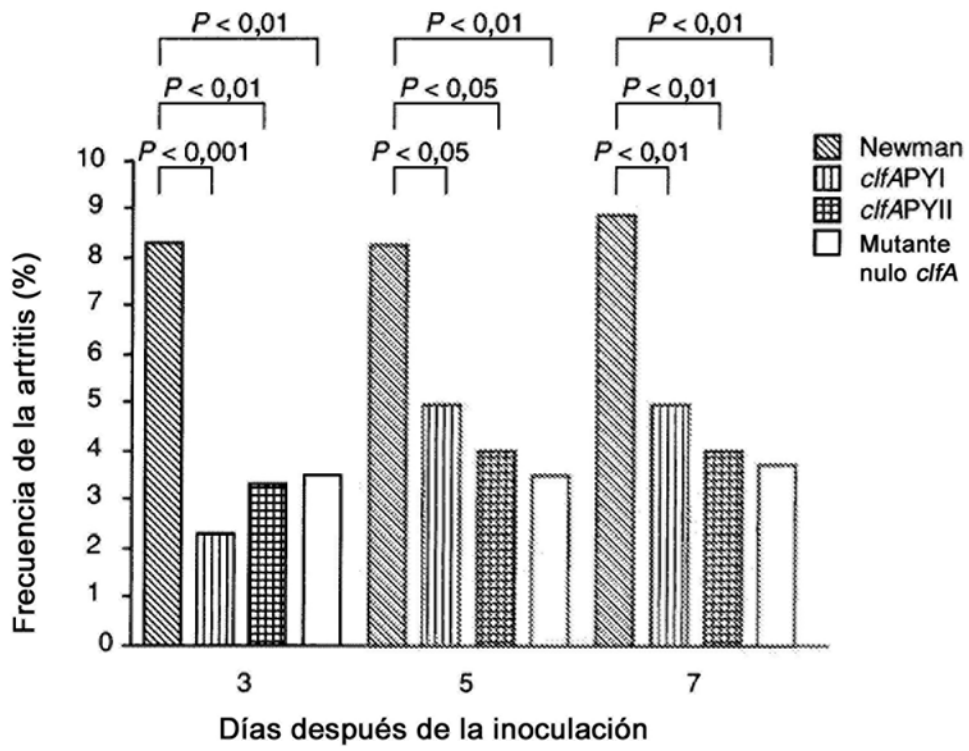


Fig. 6

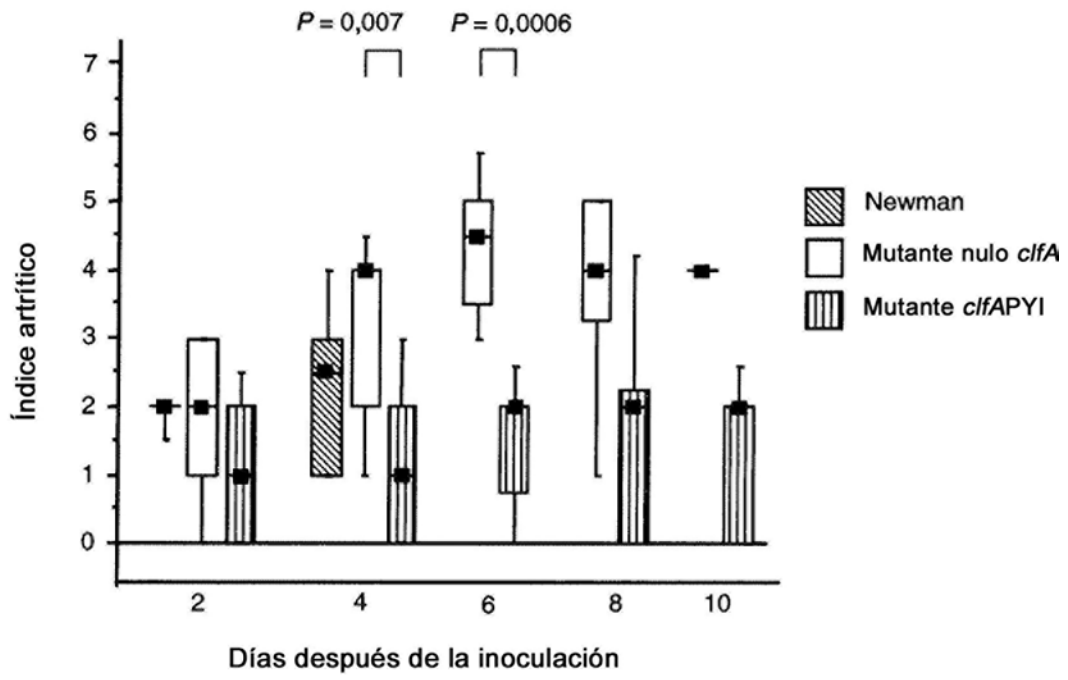


Fig. 7

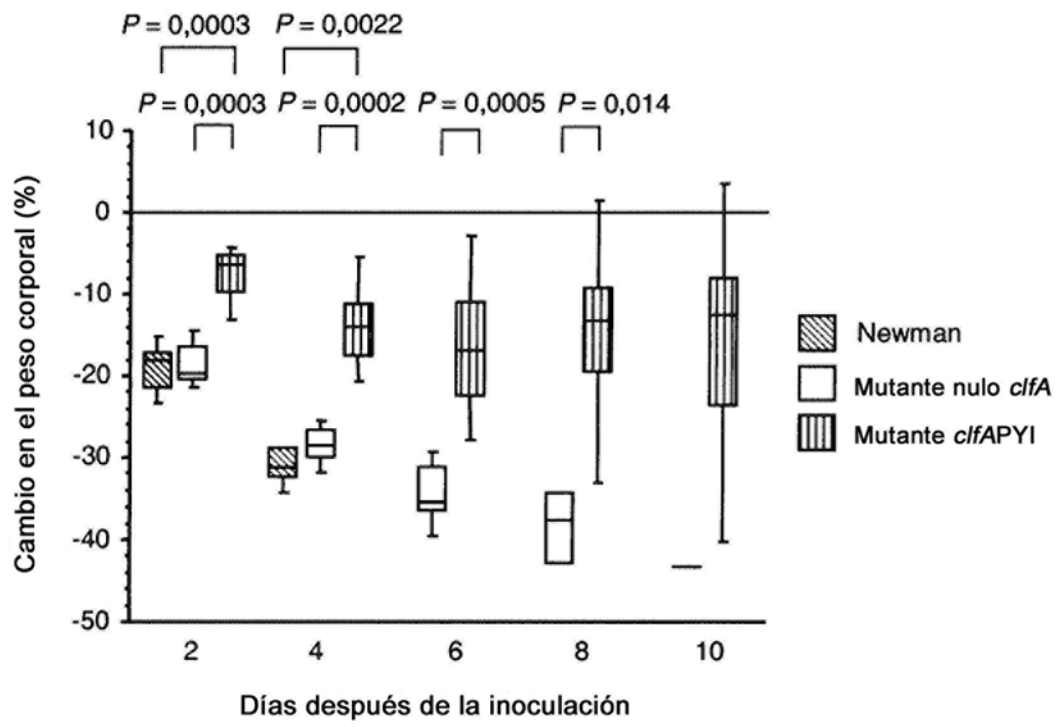


Fig. 8

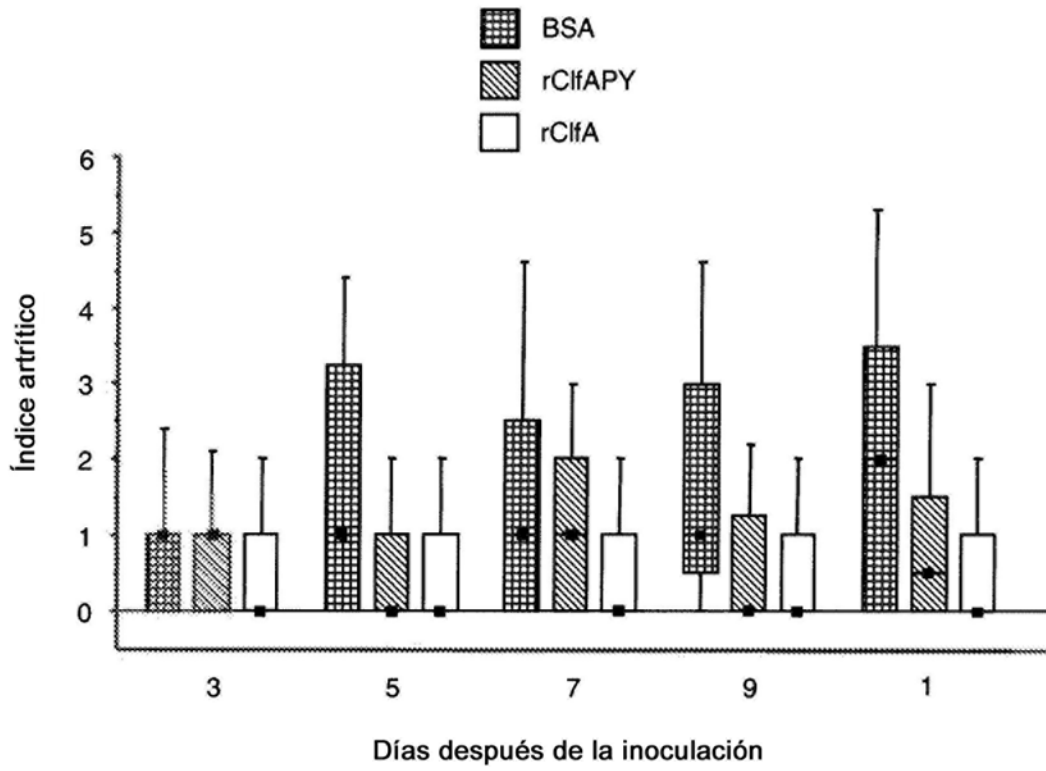


Fig. 9

Proteína del dominio A de clfA de tipo silvestre (M123) (rClfA)

agtgaaaatagtggttacgcaatctgatagcgcgaagtaacgaaagcaaaagtaatgattcaagt
 S E N S V T Q S D S A S N E S K S N D S S
 agcgttagtgctgcacctaacaacagacgacacaaaacgtgagtgatactaaaacatcgta
 S V S A A P K T D D T N V S D T K T S S
 aacactaataatggcgaaacgagtggtggcgcaaaatccagcacaacaggaaacgacacaa
 N T N N G E T S V A Q N P A Q Q E T T Q
 tcatcatcaacaatgcaactacggaagaaacgccggaactggtgaagctactactacg
 S S S T N A T T E E T P V T G E A T T T
 acaacgaatcaagctaatacaccggcaacaactcaatcaagcaatacaaatgctggaggaa
 T T N Q A N T P A T T Q S S N T N A E E
 ttagtgaatcaacaagtaatgaaacgacttttaatgatactaatacagtatcatctgta
 L V N Q T S N E T T F N D T N T V S S V
 aattcacctcaaaattctacaaatgctggaaaatgtttcaacaacgcaagatacttcaact
 N S P Q N S T N A E N V S T T Q D T S T
 gaagcaacaccttcaacaatgaatcagctccacagagtacagatgcaagtaataaagat
 E A T P S N N E S A P Q S T D A S N K D
 gtagttaatcaagcggtaatacaagtgcgctagaatgagagcatttagtttagcggca
 V V N Q A V N T S A P R M R A F S L A A
 gtagctgcagatgcaccggcagctggcacagatattacgaatcagttgacgaatgtgaca
 V A D A P A A G T D I T N Q L T N V T
 gttggtattgactctggtacgactgtgtatccgcaccaagcaggttatgtcaaactgaat
 V G I D S G T T V Y P H Q A G Y V K L N
 tatggtttttcagtgccctaatctgctgttaaagggtgacacattcaaaataactgtacct
 Y G F S V P N S A V K G D T F K I T V P
 aaagaattaaacttaaatggtgtaacttcaactgctaaagtgccaccaattatggctgga
 K E L N L N G V T S T A K V P P I M A G
 gatcaagttatggcaaatggtgtaatcgatagtgatggttaattttatacatttaca
 D Q V L A N G V I D S D G N V I Y T F T
 gactatgtaataactaaagatgatgtaaaagcaactttgacatgcccgttatattgac
 Y V N T K D D V K A T L T M A I D
 cctgaaaatgttaaaaagacaggttaattgtgacattggctactggcataggtagtaaca
 P E N V K K T G N V T L A T G I G S T T
 gcaaacaaaacagttatgtagattatgaaaaataggttaagttttataacttatctatt
 A N K T V L V D Y E K Y G K F Y N L S I
 aaaggtaacaattgaccaaactcgataaaacaaataatcgtatcgtcagacaattttatgct
 K G T I D Q I D K T N N T Y R Q T I Y V
 aatccaagtggagataacggttattgcccgggttttaacaggttaatttaaaaccaaatac
 N P S G D N V I A P V L T G N L K P N T
 gatagtaatgcattaatagatcagcaaaatacaagtaataaagtatataaagtatagataat
 D S N A L I D Q Q N T S I K V Y K V D N
 gcagctgatttatctgaaagttactttgtgaatccagaaaactttgaggatgtcactaat
 A A D L S E S Y F V N P E N F E D V T N
 agtgtgaatattacattcccaaatacaaatcaatataaagttagagtttaatacgcctgat
 S V N I T F P N P N Q Y K V E F N T P D
 gatcaaatcaaacaccgtatataagtagttgtaaatgggtcatattgatccgaatagcaaa
 D Q I T T P Y I V V V N G H I D P N S K
 ggtgatttagctttacgttcaactttataggggtataactcgaatataatttggcgctct
 G D L A L R S T L Y G Y N S N I I W R S
 atgtcatgggacaacgaagtagcatttaataacggatcaggttctggtgacggtatcgat
 M S W D N E V A F N N G S G S G D G I D
 aaaccagttgttctgaacaacctgatgagcctggtgaaattgaaccaattccagag
 K P V V P E Q P D E P G E I E P I P E

Fig. 10

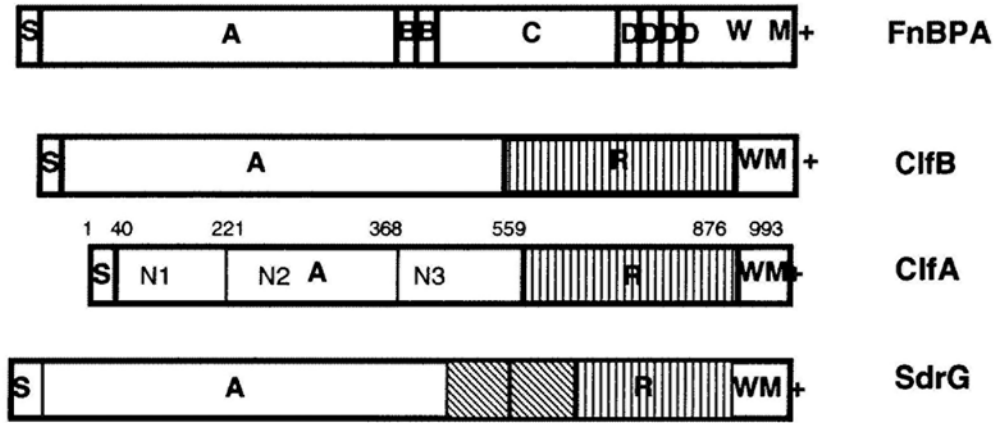


Fig. 11

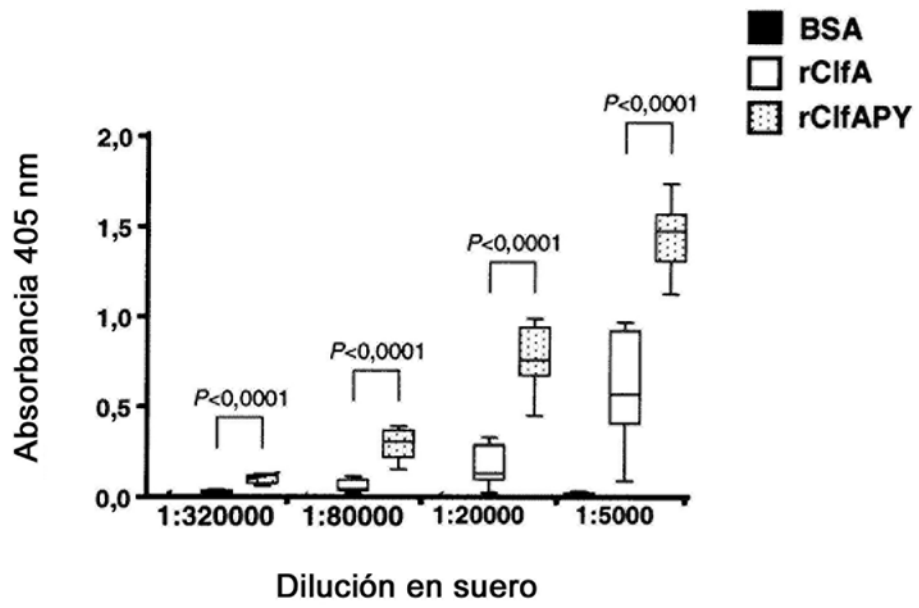


Fig. 12

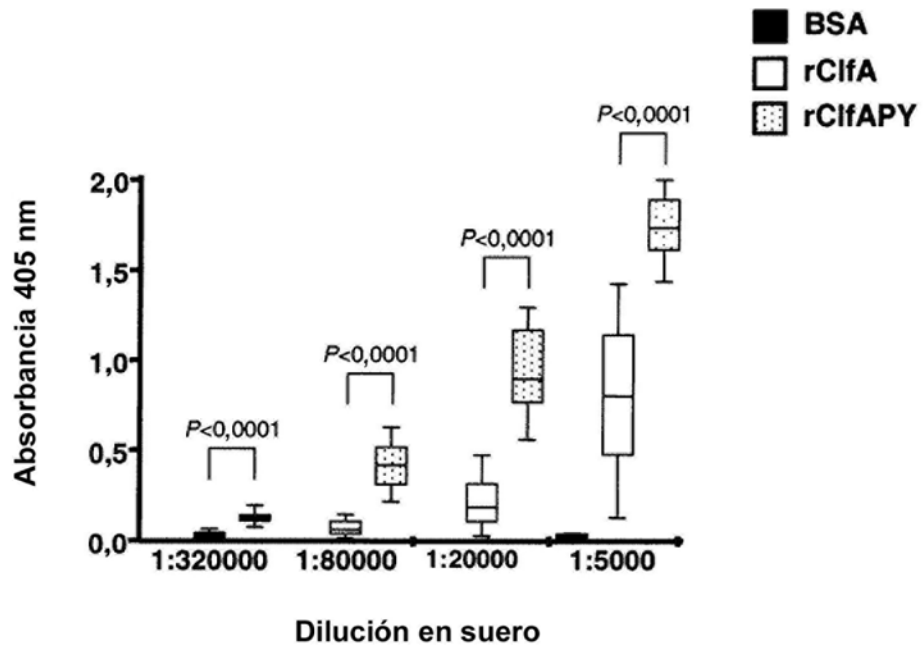


Fig. 13

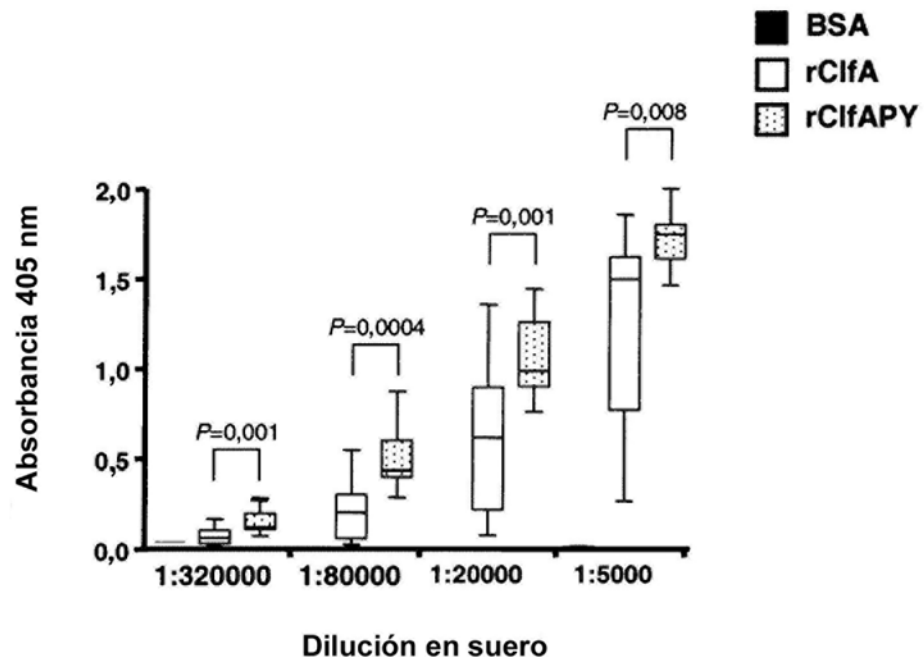


Fig. 14

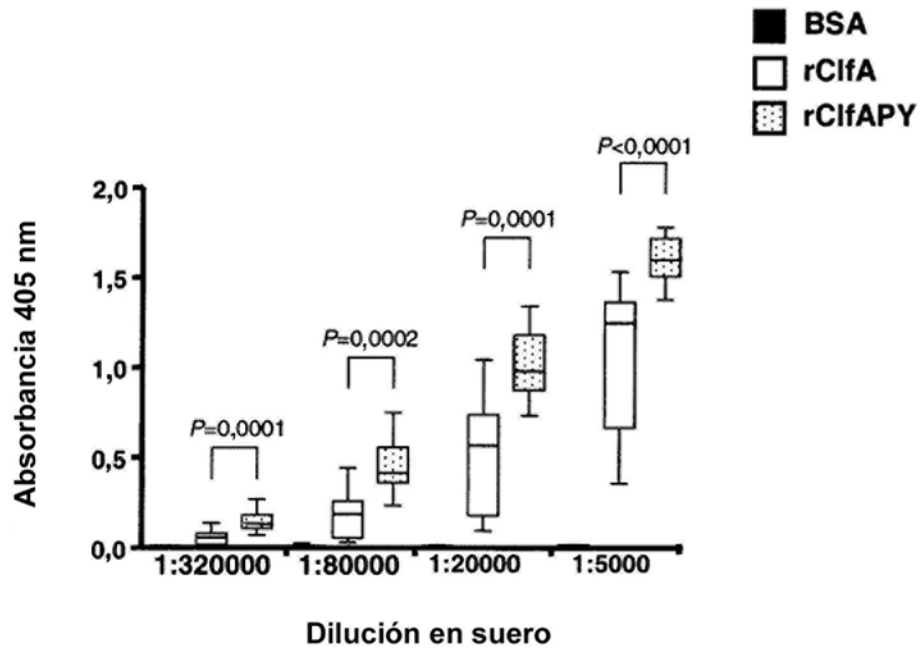


Fig. 15

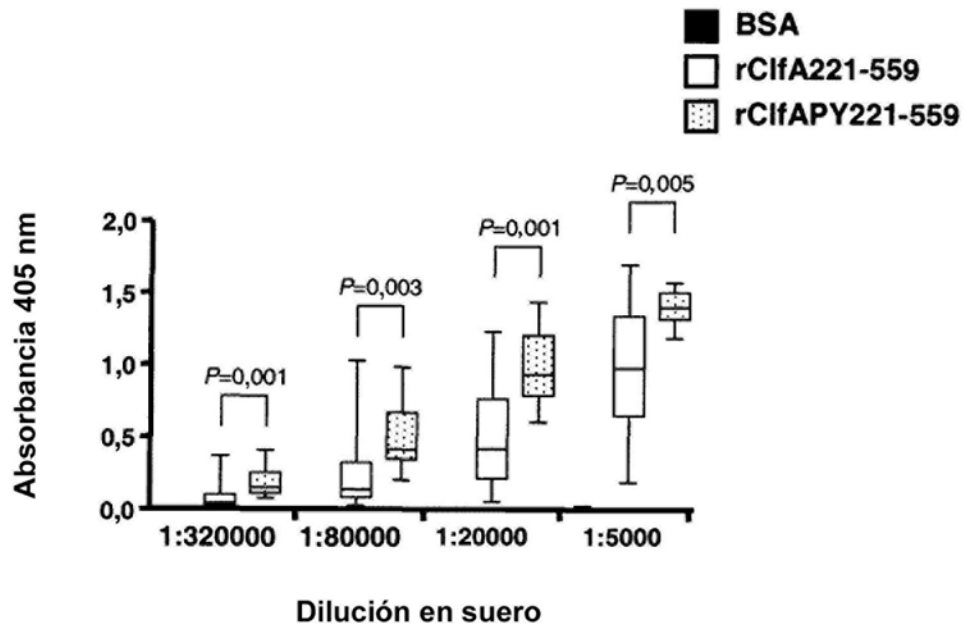


Fig. 16

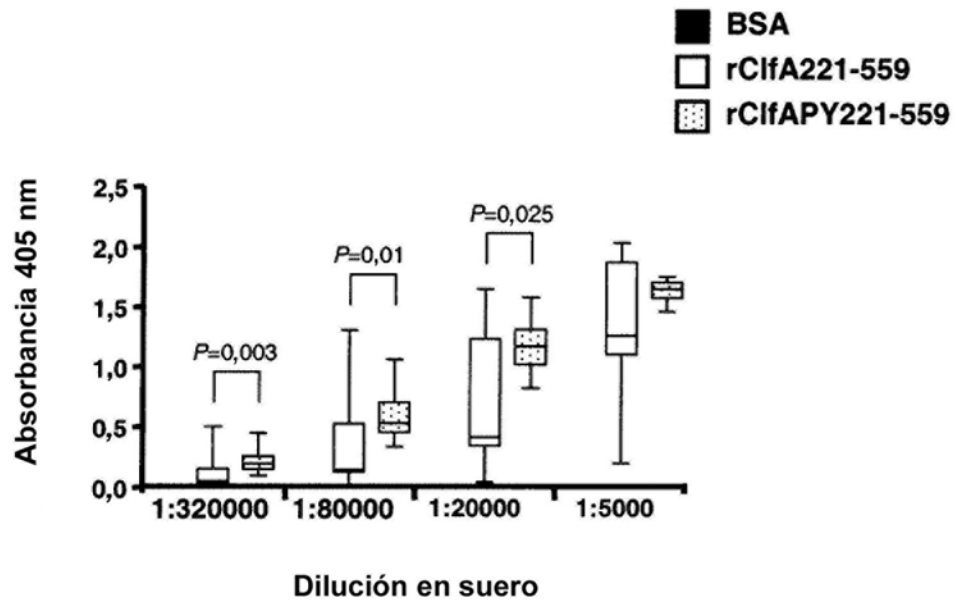


Fig. 17

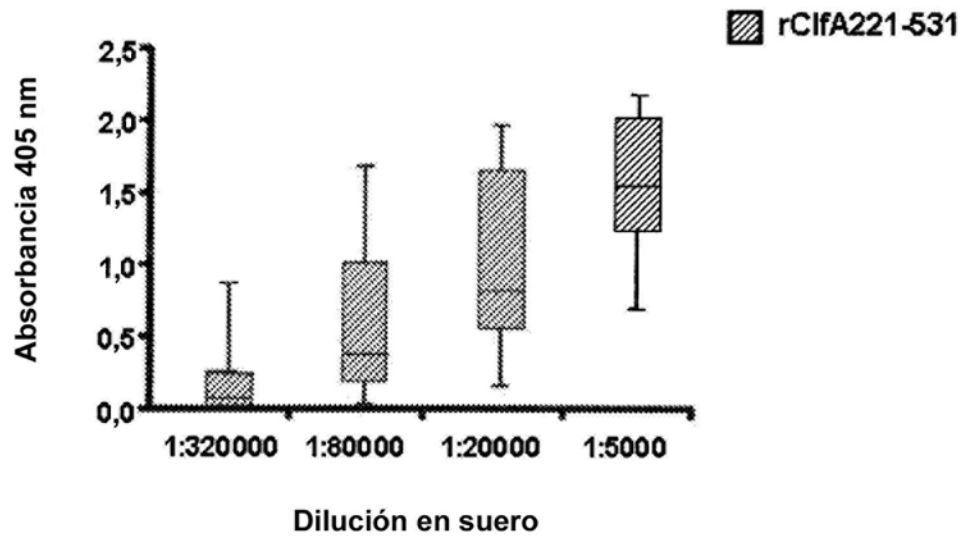


Fig. 18

ClfA₄₀₋₅₅₉ D321Y/P336S/Y338A

agtgaaaatagtggttacgcaatctgatagcgcaagtaacgaaagcaaaagtaatgattca
 S E N S V T Q S D S A S N E S K S N D S
 agtagcggttagtgctgcacqtaaaacagacgacacaaacgtgagtgataactaaaacatcg
 S S V S A A P K T D D T N V S D T K T S
 tcaaacactaataatggcgaaacgagtggtggcgcaaaatccagcacaacaggaacgaca
 S N T N N G E T S V A Q N P A Q Q E T T
 caatcatcatcaacaaatgcaactacggaagaaacgcccggtaactgggtaagctactact
 Q S S S T N A T T E E T P V T G E A T T
 acgacaacgaatcaagctaatacaccggcaacaactcaatcaagcaatacaaatgcccggag
 T T T N Q A N T P A T T Q S S N T N A E
 gaattagtgaaatcaacaagtaatgaaacgacttttaatgataactaatacagtatcatct
 E L V N Q T S N E T T F N D T N T V S S
 gtaaatccacctcaaaattctacaatgcccggaaaatgtttcaacaacgcaagatacttca
 V N S P Q N S T N A E N V S T T Q D T S
 actgaagcaacaccttcaacaatgaatcagctccacagagtacagatgcaagtaataaa
 T E A T P S N N E S A P Q S T D A S N K
 gatgtagttaatcaagcgggttaatacaagtgccgctagaatgagagcatttagtttagcg
 D V V N Q A V N T S A P R M R A F S L A
 gcagtagctgcagatgcaccggcagctggcacagatattacgaatcagttgacgaatgtg
 A V A A D A P A A G T D I T N Q L T N V
 acagttggatttgactctggtacgactgtgtatccgcaccaagcaggttatgtcaaactg
 T V G I D S G T T V Y P H Q A G Y V K L
 aattatgggttttcagtgccctaattctgctgttaaagggtgacacattcaaaataactgta
 N Y G F S V P N S A V K G D T F K I T V
 cctaaagaattaaacttaaatgggtgaacttcaactgctaaagtgccaccaattatggct
 P K E L N L N G V T S T A K V P P I M A
 ggagatcaagtattggcaaatgggtgaatcgatagtgatggtaatgttattatatacattt
 G D Q V L A N G V I D S D G N V I Y T F
 acactactatgaaataactaagatgagtaaaagcaactttgaccatgaccgctattt
 T Y V N T K D D V K A T L T M A I
 gaccctgaaaatgttaaaaagacaggtaatgtgacattggctactggcataggtagtaca
 D P E N V K K T G N V T L A T G I G S T
 acagcaaaacaaacagttatttagttagattatgaaaaataggttaagttttataacttatct
 T A N K T V L V D Y E K Y G K F Y N L S
 attaaaggtacaattgaccaaactcgataaaacaaataatacgtatcgtcagacaatttat
 I K G T I D Q I D K T N N T Y R Q T I Y
 gtcaatccaagtgagataacgttattgcccgggttttaacaggttaattaaaaccaaat
 V N P S G D N V I A P V L T G N L K P N
 acggatagtaatgcattaatagatcagcaaaatacaagtattaagtatataaagtagat
 T D S N A L I D Q Q N T S I K V Y K V D
 aatgcagctgatttatctgaaagttactttgtgaatccagaaaactttgaggatgtcact
 N A A D L S E S Y F V N P E N F E D V T
 aatagtgtagaattacattcccaaatcccaatcaatataaagtagagtttaatacgcct
 N S V N I T F P N P N Q Y K V E F N T P
 gatgatcaaaattacaacaccgtatataagtagttgttaatgggtcatattgatccgaatagc
 D D Q I T T P Y I V V V N G H I D P N S
 aaaggtagatttagctttacgttcaactttataggggtataactcgaatataatttggcgc
 K G D L A L R S T L Y G Y N S N I I W R
 tctatgtcatgggacaacgaagtagcatttaataacggatcaggttctgggtgacgggtatc
 S M S W D N E V A F N N G S G S G D G I
 gataaaccagttgttcctgaacaacctgatgagcctgggtgaaattgaaccaattccagag
 D K P V V P E Q P D E P G E I E P I P E

Fig. 19

Clfa₄₀₋₅₅₉ D321Y/P336S/Y338A incluyendo la extensión de los extremos N y C

catcaccatcaccatcacggatcc
H H H H H H G S
agtgaaaatagtggttacgcaatctgatagcgcaagtaacgaaagcaaaagtaatgattca
S E N S V T Q S D S A S N E S K S N D S
agtagcggttagtgctgcacctaataaacagacgacacaaaacgtgagtgataactaaaacatcg
S S V S A A P K T D D T N V S D T K T S
tcaaactaataatggcgaaacgagtggtggcgcaaaatccagcacaacaggaaacgaca
S N T N N G E T S V A Q N P A Q Q E T T
caatcatcatcaacaatgcaactacggaagaacgcccggtaactggtgaagctactact
Q S S S T N A T T E E T P V T G E A T T
acgacaacgaatcaagctaatacaccggcaacaactcaatcaagcaatacaaatgcccggag
T T T N Q A N T P A T T Q S S N T N A E
gaattagtgaaatcaacaagtaatgaaacgacttttaatgataactaatacagtatcatct
E L V N Q T S N E T T F N D T N T V S S
gtaaattcactcaaaattctacaatgcccgaatggttcaacaacgcaagatacttca
V N S P Q N S T N A E N V S T T Q D T S
actgaagcaacaccttcaacaatgaatcagctccacagagtacagatgcaagtaataaa
T E A T P S N N E S A P Q S T D A S N K
gatgtagttaatcaagcggtaatacaagtgccctagaatgagagcatttagttagcg
D V V N Q A V N T S A P R M R A F S L A
gcagtagctgcagatgcaccggcagctggcacagatattacgaatcagttgacgaatg
A V A A D A P A A G T D I T N Q L T N V
acagttggtattgactctggtacgactgtgtatccgcaccaagcagggttatgtcaactg
T V G I D S G T T V Y P H Q A G Y V K L
aattatggtttttcagtgccctaatctgctgtaaaaggtgacacattcaaaataactgta
N Y G F S V P N S A V K G D T F K I T
cctaaagaatataacttaaatggtgtaacttcaactgctaaagtgccaccaattatggct
P K E L N L N G V T S T A K V P P I M A
ggagatcaagttatggcaaatggtgtaatcgatagtgatggttaattgtattatatacattt
G D Q V L A N G V I D S D G N V I Y T F
acaactatgtaataactaaagatgatgtaaaagcaactttgaccatgcccgttatt
T Y V N T K D D V K A T L T M A I
gaccctgaaaatgtaaaaaagacaggtaatgtgacattggctactggcataggtagtaca
D P E N V K K T G N V T L A T G I G S T
acagcaaacaaaacagttatgtagattatgaaaaataggttaagttttataacttatct
T A N K T V L V D Y E K Y G K F Y N L S
attaaaggtacaattgaccaaatcgataaaaacaataatcgtatcgtcagacaatttat
I K G T I D Q I D K T N N T Y R Q T I Y
gtcaatccaagtgagataacggttattgcccgggttttaacaggtaattttaaaccat
V N P S G D N V I A P V L T G N L K P N
acggatagtaatgcattaatagatcagcaaaatcaagtaataaagtatataaagttagat
T D S N A L I D Q Q N T S I K V Y K V D
aatgcagctgatttatctgaaagttactttgtgaaatccagaaaactttgaggatgctact
N A A D L S E S Y F V N P E N F E D V T
aatagtggaatattacattcccaaatccaatcaatataaagttagagtttaatacgcct
N S V N I T F P N P N Q Y K V E F N T P
gatgatcaattacaacaccgtatagtagttagttaaaggatcattgatccgaatagc
D D Q I T P Y I V V V N G H I D P N S
aaagtgatttagctttacgttcaactttatagggataactcgaatataaattggcgc
K G D L A L R S T L Y G Y N S N I I W R
tctatgtcatgggacaacgaagtagcatttaataacggatcagggttctggtgacggatc
S M S W D N E V A F N N G S G S G D G I
gataaaccagttgttctgaacaacctgatgagcctggtgaaattgaaccaattccagag
D K P V V P E Q P D E P G E I E P I P E
aagctt
K L

Fig. 20

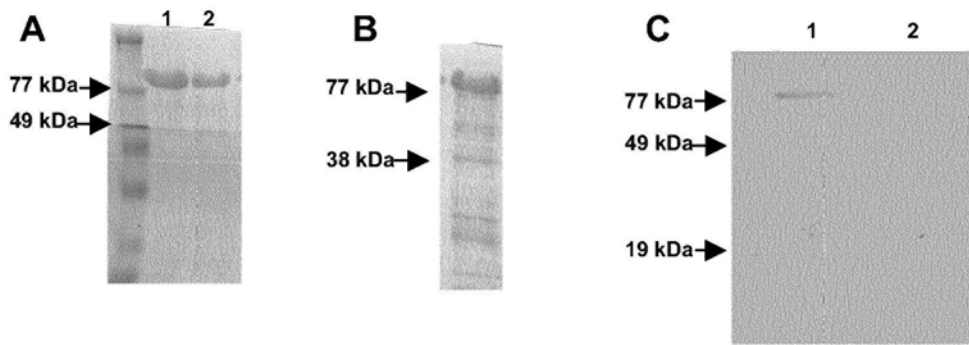


Fig. 21