

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 762**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

A61K 39/085 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2010 E 14195810 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2860191**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal humano contra la toxina alfa derivada de S. aureus y su uso en el tratamiento o prevención de la formación de abscesos**

30 Prioridad:

10.08.2009 EP 09010311

03.12.2009 US 266330 P

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

29.01.2018

73 Titular/es:

ARIDIS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)

**5941 Optical Court
San Jose, CA 95138, US**

72 Inventor/es:

**RUDOLF, MICHAEL y
KOCH, HOLGER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 651 762 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal humano contra la toxina alfa derivada de *S. aureus* y su uso en el tratamiento o prevención de la formación de abscesos

5 La presente invención se relaciona con un anticuerpo monoclonal humano específico para la toxina alfa de *S. aureus*, un hibridoma que lo produce, ácidos nucleicos que lo codifican y células huésped transfectadas con él.

10 Además, la presente invención se refiere a métodos para producir dicho anticuerpo monoclonal. Adicionalmente, la presente invención se relaciona con composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo o al menos un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo. Además, la presente invención se relaciona con el uso de dicho anticuerpo monoclonal para tratar o prevenir la formación de abscesos.

15 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es una bacteria facultativa anaeróbica, gram positiva y esférica considerada como un patógeno oportunista. *S. aureus* comúnmente coloniza la nariz, la piel y las superficies mucosas del tracto gastrointestinal de humanos sanos. Aproximadamente el 20-30% de la población está colonizada por *S. aureus* en cualquier momento dado. Estas bacterias a menudo causan infecciones menores, como granos y forúnculos en personas sanas. Normalmente, las barreras de la mucosa y la epidermis (piel) protegen contra las infecciones por *S. aureus*. La interrupción de estas barreras naturales como resultado de lesiones, como quemaduras, traumas o procedimientos quirúrgicos, aumenta drásticamente el riesgo de infección y puede causar infecciones graves y/o sistémicas. Enfermedades que comprometen el sistema inmune (por ejemplo, diabetes, enfermedad renal en etapa terminal, cáncer, SIDA y otras infecciones virales), pero también terapias inmunosupresoras, por ejemplo, como las terapias de radiación, quimioterapia y trasplante, aumentan el riesgo de infección. Las infecciones oportunistas por *S. aureus* pueden volverse bastante graves, causando endocarditis, bacteriemia, osteomielitis y formación de abscesos, lo que puede ocasionar morbilidad o mortalidad graves. Las infecciones por *S. aureus* pueden dividirse en una infección localizada, como neumonía, y en infecciones por *S. aureus* clínicamente más complejas, como infecciones de la corriente sanguínea y formación de abscesos causados por la siembra de órganos a distancia.

30 *S. aureus* es una de las principales causas en todo el mundo de infecciones del torrente sanguíneo, la piel, los tejidos blandos y del tracto respiratorio inferior. Las frecuencias de las infecciones tanto nosocomiales como adquiridas en la comunidad han aumentado constantemente a lo largo de los años. Además, el tratamiento de estas infecciones se ha vuelto más desafiante debido a la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos. En países desarrollados como los Estados Unidos, la resistencia a los antibióticos β -lactámicos en cepas de *S. aureus* resistentes a la metilicina (MRSA) es un problema importante en los hospitales y otros entornos sanitarios. En particular, la tasa de incidencia de todas las infecciones invasivas por MRSA, incluidos los que se producen fuera de los hospitales, es alta en comparación con otros patógenos bacterianos y el 20% de estas infecciones producen la muerte. Además, la aparición de resistencia adquirida a la vancomicina limitó aún más las opciones de tratamiento para infecciones severas por *S. aureus*.

40 *S. aureus* tiene un arsenal diverso de factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad. Estos pueden subdividirse ampliamente en proteínas secretadas superficiales y extracelulares. Las proteínas de superficie incluyen componentes estructurales de la pared celular bacteriana, tales como peptidoglicano y ácido lipoteicoico, y proteínas de superficie expresadas preferentemente durante el crecimiento exponencial, que incluyen la proteína A, la proteína de enlace a fibronectina y el factor de aglutinación. Las proteínas secretadas generalmente se expulsan de las células bacterianas durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano e incluyen varias toxinas, como la toxina alfa (también conocida como hemolisina alfa), la enterotoxina B, las leucocidinas (incluida la leucocidina PVL de Panton-Valentine), la lipasa y la proteasa V8. Sin embargo, a pesar del amplio conocimiento sobre las propiedades bioquímicas y moleculares de estas toxinas, el papel preciso de las toxinas en la patogénesis de las infecciones por *S. aureus* no se comprende del todo.

50 La evidencia experimental y los datos epidemiológicos han sugerido que, entre otras citotoxinas, la toxina alfa puede estar involucrada en la patogenia de la neumonía (Mc Elroy et al, 1999). Se cree que la toxina alfa se une a los receptores de superficie de las células sensibles del huésped y, por lo tanto, se adhiere a la superficie de la célula.

55 Este evento promueve la oligomerización de toxinas en un preporeo heptamérico y la inserción de una estructura de barril β con un diámetro de poro de 2 nm en la membrana plasmática. La formación del poro está causando la pérdida de la integridad de la membrana, desestabilizando las células y conduciendo finalmente a la apoptosis y a la lisis celular. En particular, los linfocitos, los macrófagos, las células epiteliales alveolares, el endotelio pulmonar y los eritrocitos son sensibles a la formación de poros por la toxina alfa; sin embargo, los granulocitos y fibroblastos parecen resistentes a la lisis (McElroy et al., 1999).

60 El papel exacto de la toxina alfa en la respuesta inflamatoria y la inducción de la respuesta inmune innata a las infecciones bacterianas no se conocen por completo. *S. aureus* expresa una serie de otros factores de virulencia y hasta la fecha la contribución de cada factor de virulencia a la manifestación de la enfermedad no se comprende completamente y plantea un desafío para el desarrollo de la profilaxis y el tratamiento de la infección clínicamente compleja por *S. aureus*.

Se sabe que la toxina alfa es uno de los factores de virulencia para el establecimiento de infecciones por *S. aureus* en el huésped y una serie de estudios han resaltado la importancia de la toxina alfa en la enfermedad. Por ejemplo, la instilación de la toxina alfa purificada en tejido de pulmón de conejo o rata desencadena una fuga vascular e hipertensión pulmonar, que se ha atribuido a la liberación de diferentes moléculas de señalización (por ejemplo, fosfatidil inositol, óxido nítrico, prostanoïdes y tromboxano A₂). En la literatura se ha demostrado que la inmunidad anti toxina alfa protege contra los efectos perjudiciales de la toxina, pero el diseño de vacunas contra la toxina alfa sigue siendo un desafío significativo.

Wardenburg y Schneewind (2008) demostraron que la gravedad de la enfermedad pulmonar en ratones se correlaciona con los niveles de toxina alfa producidos por un aislado de *S. aureus* en particular. Además, los autores demostraron que la inmunización contra una variante de toxina alfa no formadora de poros inducía inmunidad a la neumonía causada por *S. aureus*. Estos hallazgos son consistentes con un estudio del mismo grupo que demuestra que la toxina alfa es importante para la patogenia de la neumonía CA-MRSA (*S. aureus* resistente a la meticilina asociada a la comunidad). En otro contexto, los autores demostraron que los anticuerpos contra la toxina alfa también protegían las células epiteliales de los pulmones humanos de la lisis inducida por *S. aureus* (Wardenburg y Schneewind (2008)).

Aunque estos resultados indican que la toxina alfa contribuye a la destrucción del tejido pulmonar, aún no está claro si la muerte de los animales en los experimentos descritos anteriormente resultó de la destrucción directa de las células pulmonares por la toxina, de una respuesta inflamatoria excesiva o de ambas. La transferencia pasiva de anticuerpos anti toxina alfa redujo significativamente los niveles circulantes de interleucina 1 β , una citocina conocida por acompañar a la lesión pulmonar aguda. Por lo tanto, es razonable concluir que la respuesta inflamatoria puede contribuir al daño pulmonar mediado por la toxina alfa.

Durante una infección localizada como la neumonía en humanos, aproximadamente el 40% de los pacientes con neumonía por *S. aureus* desarrollan infecciones en el torrente sanguíneo y enfermedad diseminada. La diseminación de la infección bacteriana puede conducir a la infección del torrente sanguíneo y a la siembra de órganos a distancia. La infección del torrente sanguíneo puede conducir a una septicemia, una complicación que progresa rápidamente y con frecuencia mortal de las infecciones por *S. aureus*.

La diseminación de una infección por *S. aureus* también se ve comúnmente en modelos animales de pneumonia por *S. aureus*, nuevamente con aproximadamente el 40% de los animales desarrollando bacteriemia diseminada debido a daño tisular y diseminación de la infección a través de capas epiteliales en el torrente sanguíneo y tejido linfático.

Sin embargo, la diseminación depende en gran medida de los antecedentes genéticos de la cepa animal utilizada y del potencial del sistema inmune innato, como la activación de neutrófilos, para controlar el crecimiento. Por ejemplo, los animales C57B/L con los neutrófilos agotados son altamente susceptibles a las infecciones renales con *S. aureus*, mientras que los animales inmunocompetentes son resistentes a las infecciones. Por el contrario, los animales A/J eran muy susceptibles, principalmente debido al retraso en el reclutamiento de neutrófilos al riñón (von Kockritz-Blickwede, 2008).

Aunque los datos sobre la estructura y la función de las proteínas de *S. aureus* se volvieron más exhaustivos, el desarrollo de una vacuna efectiva sigue siendo un desafío.

Se hizo un intento para conferir inmunidad de manera segura a la toxina alfa y a la bacteria *S. aureus* mediante el uso de composiciones que comprenden una combinación de anticuerpos que se enlazan específicamente a un antígeno de toxina alfa de *S. aureus* y anticuerpos que se enlazan específicamente a otro antígeno bacteriano (WO 2007/145689). Estas composiciones, aunque comprenden cantidades de anticuerpo que no son eficaces por sí mismas, neutralizan sin embargo la infección y/o proporcionan protección contra la infección mediante la actividad sinérgica de la combinación de anticuerpos.

La eficacia protectora de dicha combinación de anticuerpos opsónicos y neutralizantes de la toxina de *S. aureus* a las 72 horas después de la exposición a bacterias con un aislado de *S. aureus* se demuestra en comparación con el efecto protector de la inmunización con anticuerpos neutralizantes y solo opsónicos. La combinación de los anticuerpos opsónicos y neutralizantes de toxinas demostró un efecto protector en la prevención de la infección de la piel y los tejidos blandos y la siembra de órganos. Sin embargo, el anticuerpo neutralizante anti toxina alfa divulgado por la propia solicitud de patente no es suficiente para evitar la siembra/formación de abscesos en órganos o para neutralizar la infección.

Heveker et al. (1994a, 1994b) realizaron un intento adicional que describe la neutralización de anticuerpos monoclonales murinos y humanos dirigidos contra la toxina alfa de *S. aureus*. El anticuerpo monoclonal humano del subtipo IgG/lambda se caracteriza por secuencia y muestra neutralización.

El hibridoma humano productor de anticuerpo anti toxina alfa descrito por Heveker (1994a) se aisló usando leucocitos de sangre periférica de un voluntario sano previamente inmunizado con una vacuna de prueba de toxoide alfa de *S. aureus*. Mientras que el alfa toxoide utilizado en el estudio Heveker representa una toxina alfa

químicamente modificada, se puede suponer que la modificación hace que los determinantes antigénicos sean menos inmunogénicos o incluso no inmunogénicos y, como tal, el enfoque no podría producir una inmunidad igualmente efectiva, como se demostró para otras toxinas bacterianas, como la toxina del cólera, donde las vacunas con toxoide estimulaban anticuerpos anti toxinas que no confieren inmunidad a las infecciones (Levine (1983)).

Se han identificado diversos factores en la literatura como factores de virulencia críticos para la formación de abscesos, como toxinas, peptidoglicanos, factores extracelulares y enzimas. Un posible papel de la toxina alfa en la formación de abscesos fue postulado por Kapral et al. (1980). Se informa que la toxina alfa se acumula de forma dramática en los abscesos tras la maduración de los abscesos, aunque no se pudo demostrar que la toxina alfa sea necesaria para la formación de abscesos. Una segunda publicación de Adlam et al (1977) negó un papel clave en la formación de abscesos para las toxinas alfa. Los autores demostraron que la toxina alfa desempeña un papel clave en la diseminación de la forma hemorrágica de la mastitis de conejo mama azul vista en brotes naturales.

Reprodujeron el cuadro clínico en el laboratorio con dos cepas de estafilocócos no relacionadas. Un alto título anti toxina alfa circulante confirió protección contra esta forma letal de mastitis. Por lo tanto, el título de neutralización podría prevenir el desenlace fatal modificando el cuadro clínico a la condición de absceso menos grave. Sin embargo, la neutralización de la toxina alfa no afectó/evitó la formación de abscesos en conejos. En una publicación más reciente, Kielian et al (2001) investigaron el papel de la toxina alfa en la formación de abscesos cerebrales en un modelo de ratón. Experimentalmente, los autores implantaron cepas de *S. aureus* de tipo salvaje y mutante de las mismas en el tejido cerebral del lóbulo frontal y evaluaron la capacidad de inducir abscesos cerebrales de cada cepa. Los autores usaron cepas mutantes en loci relevantes para la expresión de factores de virulencia conocidos, por ejemplo, mutantes en el locus *sarA* y el locus *agr*, ambos involucrados en la regulación global de importantes factores de virulencia. Como la toxina alfa está bajo el control del sistema regulador *sarA/agr*, los autores también incluyeron una cepa mutante de toxina alfa en sus experimentos. Los datos experimentales demostraron que la replicación de cepas bacterianas mutantes para la toxina alfa o el locus *sarA/agr* redujo la virulencia tras la inyección de células bacterianas en el cráneo en comparación con su cepa control isogénica RN6390, lo que resulta en un menor número de bacterias y pequeños focos inflamatorios en los cerebros de los animales a detectar, en comparación con los grandes abscesos bien formados en los ratones que reciben la cepa isogénica. Sin embargo, las cepas mutantes no fueron completamente avirulentas en el modelo de absceso cerebral experimental y no se puede descartar que el factor o factores adicionales además de la toxina alfa desempeñen papel o papeles críticos en la formación de abscesos cerebrales.

El papel de la toxina alfa en la formación de abscesos se evaluó en otro entorno experimental según lo descrito por Schwan et al (2003) en un análisis de modelos locales de infección por *S. aureus* sistémicos y formadores de abscesos. Los autores notaron que las cepas no hemolíticas de *S. aureus* se volvieron más abundantes a medida que pasaba el tiempo en los modelos de absceso y herida de murino, pero no dentro de los tejidos de órganos asociados con infecciones sistémicas. Por ejemplo, en una infección mixta utilizando todas las variantes de la cepa RN6390 de *S. aureus* (hiperhemolítica, hemolítica y no hemolítica) en el modelo de absceso, el grupo hiperhemolítico disminuyó notablemente el día 7 después de la infección, mientras que la población no hemolítica aumentó significativamente. La secuenciación de varios de los mutantes marcados con la firma indicó mutaciones en el gen *agrC* o dentro de la región intergénica *agrA-agrC*, lo que dio como resultado la reducción tanto de la actividad de la toxina alfa como de la toxina delta. Analizando cepas mutantes específicas para la actividad *agr* (*agr*-) y toxina alfa (*hla*-) en modelos de infección por abscesos, heridas y sistémicos, la cepa mutante *agr* y la cepa mutante *hla* no mostraron diferencias en los recuentos bacterianos en abscesos murinos en el día 4 en comparación con las cepas de tipo salvaje originales (RN6390). Lo mismo se mantuvo cierto para las infecciones locales (modelo de herida), mientras que en el modelo sistémico de infección se produjo un aclaramiento considerable de la cepa mutante *hla* y la cepa mutante *agr*. El resultado indicó claramente la importancia de la toxina alfa en las infecciones sistémicas, pero no en las infecciones locales ni en la formación de abscesos. De hecho, las infecciones mixtas con el *hla*-mutante y las cepas de tipo salvaje en el modelo de absceso mostraron una ligera ventaja dada a la población de mutantes *hla* sobre la cepa de tipo salvaje. Los autores incluso llegaron a la conclusión de que las mutaciones *agr* causan reducciones en la expresión de toxinas alfa y delta, que a su vez contribuyeron a una ventaja de crecimiento de este grupo de *agr* mutantes dentro de una población mixta de células de *S. aureus* que viven en abscesos y heridas. Los resultados aparentemente contradicen los resultados descritos por Kielian et al, donde la falta de producción de toxina alfa redujo la virulencia bacteriana. Por lo tanto, el papel de la toxina alfa en la formación de abscesos no está claro.

En general, no hay evidencia que apunte a un solo factor de virulencia como el principal impulsor en la formación de abscesos. Como tal la investigación se centró en la presencia de factores adicionales no completamente controlados por *S. aureus*, tales como factores ambientales, o se le dieron motivos estructurales como el factor clave común en la formación de abscesos. Por ejemplo, los datos más recientes con respecto a los factores de virulencia que afectan la formación de abscesos apuntan a los efectos de los iones metálicos bivalentes no quelados, como Mn^{++} y Ca^{++} en la formación de abscesos y el crecimiento bacteriano dentro de los abscesos. La quelación de iones metálicos en animales inhibió la formación de abscesos hepáticos e inhibió el crecimiento de *S. aureus* en abscesos (Corbin 2008). Por otro lado Tzianabos et al. (2001) plantearon la hipótesis de que un organismo como *S. aureus* requiere factores de virulencia presentes en la célula bacteriana para establecer estructuras patológicas tales como abscesos en el tejido. Demostraron que las cepas altamente asociadas con casos clínicos de abscesos pueden poseer uno o

más polisacáridos asociados a la pared celular con un motivo de carga zwitteriónica (un compuesto químico que lleva una carga neta total de 0, por lo tanto eléctricamente neutro pero con cargas positivas y negativas formales en átomos diferentes). En ausencia del motivo de carga zwitteriónica, no se pudo observar la formación de abscesos.

5 Los autores concluyeron que estos polímeros de polisacáridos pueden modular la inducción del absceso por este organismo. Además, presentaron datos confirmatorios no solo para los polisacáridos centrales CP5 y CP8 sino también para el ácido lipoteicoico (LTA), un factor de virulencia adicional bien caracterizado dentro de la pared celular. Identificaron un motivo de carga zwitteriónica dentro del LTA también y, por lo tanto, generalizaron su hipótesis de formación de abscesos a la presencia de un motivo de carga zwitteriónica en cualquier factor de virulencia crucial para la formación de abscesos.

10 En base a los resultados que indican que diversos factores contribuyen a la formación de abscesos mediados por *S. aureus*, una persona experta en la técnica no esperaría que la neutralización de un único factor impidiera la formación de abscesos.

15 Por lo tanto, un objeto de la invención es la provisión de medios y métodos para la profilaxis y la terapia de la infección clínicamente compleja por *S. aureus*, tal como la formación de abscesos.

20 Por consiguiente, un problema técnico que subyace a la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal específico para la toxina alfa derivado de *S. aureus*, en el que el anticuerpo tiene capacidad protectora in vivo, contra la infección de *S. aureus* clínicamente compleja, tal como la formación de abscesos.

El problema técnico se resuelve con los anticuerpos monoclonales como se define a continuación.

25 La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal específico para toxina alfa de *S. aureus*, en la que la región variable de la cadena ligera del anticuerpo comprende la SEQ ID NO:1 en la región CDR1, la SEQ ID NO:2 en la región CDR2 y la SEQ ID NO:3 en la región CDR3, y en el que la región variable de la cadena pesada del anticuerpo comprende la SEQ ID NO:4 en la región CDR1, la SEQ ID NO:5 en la región CDR2 y la SEQ ID NO:6 en la región CDR3, o un fragmento o muteína de la misma capaz de enlazarse a la toxina alfa de *S. aureus*, en el que el fragmento es un fragmento Fab o F(ab')₂ o una mezcla de los mismos; y en el que la muteína no tiene más de 5 sustituciones conservativas, en el que una sustitución conservativa es la sustitución de un aminoácido perteneciente a un grupo fisicoquímico particular con un aminoácido que pertenece al mismo grupo fisicoquímico, en el que el anticuerpo es capaz de prevenir la formación de abscesos causados por una infección por *S. aureus*.

35 La presente invención proporciona además un anticuerpo monoclonal específico para la toxina alfa de *S. aureus*, en el que la región variable de la cadena ligera del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:7 y la región variable de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8, o un fragmento Fab o F(ab')₂ de la misma capaz de enlazarse a la toxina alfa de *S. aureus*, o una variante de dicho anticuerpo capaz de enlazarse a la toxina alfa de *S. aureus*, en la que la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de dicha variante del anticuerpo es idéntica al menos en un 95% a la SEC ID NO:7 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de dicha variante del anticuerpo es idéntica al menos en un 95% a la SEQ ID NO:8, en la que el anticuerpo es capaz de prevenir la formación de un absceso causado por una infección por *S. aureus*.

45 Aquí se divulga un anticuerpo monoclonal denominado 243-4 específico para la toxina alfa de *S. aureus*, en el que la región variable de la cadena ligera del anticuerpo comprende al menos una de la SEQ ID NO:1 en la región CDR1, la SEQ ID NO:2 en la región CDR2 y la SEQ ID NO:3 en la región CDR3, y en el que la región variable de la cadena pesada del anticuerpo comprende al menos una de la SEQ ID NO:4 en la región CDR1, la SEQ ID NO:5 en la región CDR2 y la SEQ ID NO:6 en la región CDR3, o un fragmento o muteína de la misma capaz de enlazar a la toxina alfa de *S. aureus*, en el que la muteína del anticuerpo monoclonal lleva al menos una sustitución conservativa en una cualquiera de las regiones CDR en la cadena pesada o ligera.

50 Se divulga adicionalmente aquí un anticuerpo monoclonal humano, específico para la toxina alfa de *S. aureus* en el que la región variable de la cadena ligera del anticuerpo comprende la SEC ID NO:1 en la región CDR1, la SEC ID NO:2 en la región CDR2 y la SEQ ID NO:3 en la región CDR3, y en el que la región variable de la cadena pesada del anticuerpo comprende la SEQ ID NO:4 en la región CDR1, la SEQ ID NO:5 en la región CDR2 y la SEQ ID NO:6 en la región CDR3; o un fragmento o muteína del mismo capaz de enlazar la toxina alfa del *S. aureus* en el que la muteína del anticuerpo monoclonal lleva al menos una sustitución conservativa en una cualquiera de las regiones CDR en la cadena pesada o ligera.

60 Sorprendentemente, se ha encontrado que los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención exhiben una alta capacidad protectora contra la formación de abscesos. La prevención de la formación de abscesos se ha demostrado en un modelo de riñón de ratón mediante la administración de un anticuerpo monoclonal humano específico de toxina alfa de acuerdo con la invención. En base a la naturaleza de la toxina, es decir, que es una proteína secretada en lugar de un componente asociado a la pared celular (polisacárido), cualquier efecto bactericida directo, por ejemplo, la eliminación de la célula bacteriana o la función efectora indirecta relacionada con

el sistema inmune, como la opsonofagocitosis mediada por el complemento, pueden descartarse y no explica la falta de formación de abscesos.

5 El término "anticuerpo monoclonal" como se usa aquí abarca cualquier anticuerpo monoclonal humano parcial o totalmente independiente de la fuente a partir de la cual se obtiene el anticuerpo monoclonal. Se prefiere un anticuerpo monoclonal completamente humano. Se prefiere la producción del anticuerpo monoclonal por un hibridoma. El hibridoma puede ser un hibridoma de mamífero, tal como murino, bovino o humano. Un hibridoma preferido es de origen humano. El anticuerpo monoclonal también se puede obtener por ingeniería genética y en particular injerto de CDR de los segmentos de CDR como se define en las reivindicaciones sobre anticuerpos monoclonales disponibles reemplazando las regiones de CDR del anticuerpo de fondo con los segmentos de CDR específicos como se define en las reivindicaciones.

10 El término "región CDR" significa la región determinante de complementariedad de un anticuerpo, es decir, la región que determina la especificidad de un anticuerpo para un antígeno particular. Tres regiones CDR (CDR1 a CDR3) tanto en la cadena ligera como en la pesada son responsables del enlace al antígeno.

15 Las posiciones de las regiones CDR dentro de la cadena pesada son las siguientes:

20 Los aminoácidos 26 a 33 de la región CDR1 dentro del exón V_H,
Los aminoácidos 51 a 58 de la región CDR2 dentro del exón V_H,
Los aminoácidos 97 a 110 de la región CDR3 dentro del exón V_H.

Las posiciones de las regiones CDR son independientes de la clase de anticuerpo, es decir, IgM, IgA o IgG.

25 Las posiciones de la región CDR dentro de la cadena ligera tipo lambda son las siguientes:

30 Los aminoácidos 26 a 33 de la región CDR1 dentro del exón V_L,
Los aminoácidos 51 a 53 de la región CDR2 dentro del exón V_L,
Los aminoácidos 90 a 101 de la región CDR3 dentro del exón V_L.

Las alineaciones de aminoácidos del exón V_H, V_λ y V_L pueden obtenerse de la base de datos V Base (http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/share/textes/).

35 El término "fragmento" significa cualquier fragmento del anticuerpo capaz de enlazarse a la toxina alfa de *S. aureus*.

40 El fragmento tiene una longitud de al menos 10, preferiblemente 20, más preferiblemente 50 aminoácidos. Se prefiere además que el fragmento comprenda la región de enlace del anticuerpo. Se prefiere que el fragmento sea un anticuerpo Fab, F(ab')₂, de cadena simple o de dominio. El más preferido es un fragmento Fab o F(ab')₂ o una mezcla de los mismos. Los fragmentos de anticuerpos pueden estar glicosilados, por ejemplo, que contienen unidades estructurales de carbohidratos en las regiones variables del anticuerpo.

Por consiguiente, la presente invención proporciona además un anticuerpo monoclonal como se define aquí, en el que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo Fab, F(ab')₂, de cadena simple o de dominio.

45 El término "muteína" abarca cualquier muteína del anticuerpo monoclonal que difiere por la adición, delección y/o sustitución de al menos un aminoácido. Preferiblemente, la muteína del anticuerpo monoclonal lleva al menos una sustitución conservativa en cualquiera de las CDRs en la cadena pesada y/o cadena ligera como se indica en las reivindicaciones. Más preferiblemente, la muteína no tiene más de 5, no más de 4, preferiblemente no más de 3, particularmente preferido no más de 2 sustituciones conservativas. La capacidad del fragmento o muteína del anticuerpo para ser capaz de enlazarse a la toxina alfa de *S. aureus* se determina mediante ELISA directo como se describe en la sección de Ejemplo: la toxina alfa purificada se inmoviliza en la fase sólida de las placas de ELISA.

50 Los fragmentos de anticuerpo o las muteínas de los anticuerpos se incuban con la toxina alfa inmovilizada, y los anticuerpos enlazados o las muteínas de los mismos se visualizan mediante un anticuerpo adecuado secundario conjugado con enzima.

55 El término "sustitución conservativa" significa un reemplazo de un aminoácido que pertenece a un grupo fisicoquímico particular con un aminoácido que pertenece al mismo grupo fisicoquímico. Los grupos fisicoquímicos se definen de la siguiente manera:

60 El grupo fisicoquímico de aminoácidos no polares comprende: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina y triptófano. El grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales polares no cargadas comprende asparagina, glutamina, tirosina, cisteína y cistina. El grupo fisicoquímico de aminoácidos que tiene una cadena lateral polar con carga positiva comprende lisina, arginina e histidina. El grupo fisicoquímico de aminoácidos que tiene una cadena lateral polar con carga negativa comprende ácido aspártico y ácido glutámico, con sus aniones carboxilato también denominados aspartato y glutamato.

Se divulga adicionalmente aquí un anticuerpo monoclonal específico para la toxina alfa de *S. aureus*, en el que la región variable de la cadena ligera del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 y la región variable de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:8, o un fragmento de la misma capaz de enlazarse a la toxina alfa de *S. aureus*, o una variante de dicho anticuerpo capaz de enlazarse a la toxina alfa de *S. aureus*, en la que la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO:7 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO:8

El término "variante", como se usa aquí, se refiere a un polipéptido, en el que la secuencia de aminoácidos exhibe un cierto grado de identidad con la secuencia de aminoácidos como se establece en la lista de secuencias.

El término "% de identidad" conocido por las personas experimentadas en la técnica designa el grado de relación entre dos o más moléculas de polipéptido, que se determina mediante el acuerdo entre las secuencias. El porcentaje de "identidad" se encuentra a partir del porcentaje de regiones idénticas en dos o más secuencias, teniendo en cuenta los intervalos u otras características de secuencia.

El porcentaje de identidad de los polipéptidos mutuamente relacionados se puede determinar por medio de procedimientos conocidos. Como regla general, se utilizan programas informáticos especiales con algoritmos que tienen en cuenta los requisitos especiales. Los procedimientos preferidos para la determinación de la identidad en primer lugar generan la mayor concordancia entre las secuencias estudiadas. Los programas informáticos para la determinación de la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete del programa GCG, que incluye GAP (Devereux J et al., (1984); Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison (WI); BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul S et al., (1990)). El programa BLAST X puede obtenerse del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y de otras fuentes (BLAST Handbook, Altschul S et al., NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul S et al., 1990). El conocido algoritmo de Smith Waterman también puede usarse para la determinación del porcentaje de identidad.

Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias incluyen los siguientes:

Algoritmo:	Needleman S.B. y Wunsch, C.D. (1970)
Matriz de Comparación:	BLOSUM62 de Henikoff S. y Henikoff J.G. (1992)
Penalización de intervalo:	12
Penalización por longitud de intervalo:	2

El programa GAP también es adecuado para usar con los parámetros anteriores. Los parámetros anteriores son los parámetros estándar (parámetros estándar) para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, en las que los intervalos en los extremos no disminuyen el valor de identidad. Con secuencias muy pequeñas en comparación con la secuencia de referencia, puede ser además necesario aumentar el valor de expectativa hasta 100.000 y en algunos casos reducir la longitud de palabra (tamaño de palabra) a 2.

Se pueden utilizar otros algoritmos modelo, penalizaciones por apertura de intervalo, penalizaciones por extensión de intervalo y matrices de comparación, incluidas las mencionadas en el Manual del programa, Wisconsin Package, Versión 9, septiembre de 1997. La elección dependerá de la comparación que se realice y de si la comparación se realiza entre pares de secuencias, donde se prefiere GAP o Best Fit, o entre una secuencia y una base de datos de secuencias grandes, donde se prefieren FASTA o BLAST. Un acuerdo del 85% determinado con los algoritmos antes mencionados se describe como el 85% de identidad. Lo mismo aplica para grados más altos de identidad.

En realizaciones preferidas, las variantes de acuerdo con la invención tienen una identidad de 85% o más, preferiblemente 90% o más, y más preferiblemente 95% o más.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humano. El término "humano", como se usa aquí, significa que el anticuerpo monoclonal humano está sustancialmente libre de secuencias de aminoácidos de especies foráneas, preferiblemente el anticuerpo monoclonal humano consiste enteramente en una secuencia de aminoácidos humanos.

La cadena ligera del anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención puede ser del tipo kappa o lambda.

En una realización preferida de la invención, la cadena ligera es del tipo lambda. La cadena ligera puede ser una cadena natural que incluye un tipo de cadena ligera naturalmente reordenada, modificada genéticamente o sintética.

La cadena pesada del anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede seleccionar de los isotipos IgM, IgA o IgG, preferiblemente IgG.

5 De acuerdo con una realización preferida adicional de la invención, la cadena pesada del anticuerpo monoclonal es del tipo IgG.

10 El término "capaz de enlazar" como se usa aquí se refiere al enlace que se produce entre un anticuerpo y su antígeno reconocido al que se produjo el anticuerpo. Este tipo de enlace es enlace específico en contraste con no específico que ocurre en ausencia del antígeno.

15 Los anticuerpos capaces de enlazar a la toxina alfa se preparan usando una tecnología de hibridoma, en la que la célula B es una célula B de mamífero, tal como murino, bovino o humano. Preferiblemente, la célula B es una célula B humana. Alternativamente, el anticuerpo monoclonal capaz de enlazar a la toxina alfa se puede obtener mediante injerto de CDR de las regiones CDR como se indica en las reivindicaciones sobre anticuerpos monoclonales disponibles produciendo de este modo un anticuerpo monoclonal específico para la toxina alfa de *S. aureus* de acuerdo con la presente invención.

20 En una realización adicional de la invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal capaz de enlazar la toxina alfa de *S. aureus*, que puede obtenerse a partir de una célula B de mamífero, tal como murino, bovino o humano, preferiblemente una célula B humana o un hibridoma obtenido por fusión de dicha célula B humana con una célula de mieloma o heteromieloma.

25 En una realización adicional, la invención proporciona un hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal capaz de enlazar la toxina alfa de *S. aureus* como se define aquí.

30 El término "toxina alfa" como se usa aquí se refiere a una proteína bacteriana producida por *S. aureus*. La toxina alfa sufre oligomerización en un preporo heptamérico después de enlazarse a la superficie celular de la célula huésped. La formación del poro es una causa principal de apoptosis y lisis celular. La capacidad del anticuerpo monoclonal para enlazar tanto a las formas monoméricas como oligoméricas de la toxina alfa derivada de *S. aureus* es, por lo tanto, de fundamental importancia para una protección potente.

35 El anticuerpo monoclonal de la invención es capaz de enlazar específicamente a formas monoméricas y oligoméricas de toxina alfa de *S. aureus*. El anticuerpo monoclonal de la invención o fragmento o muteína del mismo es capaz de enlazarse específicamente a formas monoméricas u oligoméricas de toxina alfa de *S. aureus* o a ambas.

40 El término "forma oligomérica" como se usa en este documento incluye una forma distinta a la forma monomérica de toxina alfa, tal como dimérica, trimérica, tetramérica, pentámera, hexámera, heptamérica, etc. o formas poliméricas, tales como la forma heptamérica de preporo de la toxina alfa.

45 De acuerdo con una realización preferida adicional, el anticuerpo monoclonal de la invención es terminalmente N, internamente o terminalmente C modificado. Las modificaciones incluyen la di, oligo o polimerización de la forma monomérica, por ejemplo, mediante entrecruzamiento usando diciclohexilcarbodiimida. Los di, oligo o polímeros así producidos pueden separarse uno del otro mediante filtración en gel. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones de la cadena lateral, por ejemplo, modificaciones de residuos de ϵ -amino-lisina, o modificaciones de amino y carboxi terminal, respectivamente. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones postraduccionales, por ejemplo, glicosilación y/o deglicosilación parcial o completa de la proteína y formación de enlaces disulfuro. El anticuerpo también puede conjugarse a un marcador, tal como un marcador enzimático, fluorescente o radioactivo. Preferiblemente, la modificación se selecciona a partir de al menos uno de oligomerización, glucosilación o conjugación a un fármaco o un marcador.

50 Además, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente, del anticuerpo monoclonal de la presente invención. El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico de origen natural derivado de la línea germinal o de la reorganización que se produce en las células B, 55 alternativamente, los ácidos nucleicos pueden ser sintéticos. Los ácidos nucleicos sintéticos también incluyen ácidos nucleicos que tienen enlaces internucleosídicos modificados que incluyen fosfotioéster para aumentar la resistencia de los ácidos nucleicos a la degradación. El ácido nucleico puede modificarse por ingeniería genética o producirse de forma completamente sintética mediante síntesis de nucleótidos.

60 La presente invención proporciona un vector que comprende los ácidos nucleicos que codifican la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de la invención; preferiblemente, el vector también comprende un promotor unido operativamente al ácido nucleico para facilitar la expresión del mismo.

65 Aquí se divulgan vectores, que comprenden al menos un ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de la presente invención y/o al menos un ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de la presente invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en el mismo vector o pueden

estar presentes en forma de vectores binarios. El vector preferiblemente comprende el promotor unido operativamente al ácido nucleico para facilitar la expresión del ácido nucleico que codifica la cadena ligera y/o la cadena pesada. Preferiblemente, el vector también incluye un origen para replicación y mantenimiento en una célula huésped. El vector también puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal ubicada en 5' del ácido nucleico que codifica la cadena ligera o la cadena pesada. La secuencia señal puede facilitar la secreción de la cadena codificada en el medio.

Preferiblemente, el vector se deriva de adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, virus SV40, retrovirus, virus de plantas o bacteriófagos tales como derivados de lambda o M13. El vector particularmente preferido es un vector que contiene las regiones constantes de cadenas pesadas de Ig humanas y cadenas ligeras humanas, tales como el sistema de vector integrado para la expresión eucariota de inmunoglobulinas descrito por Persic et al., 1987.

Además, la presente invención proporciona células huésped que comprenden el vector y/o el ácido nucleico adecuado para la expresión del vector. En la técnica, se conocen numerosos sistemas de expresión procariotas y eucariotas en los que células huésped eucariotas tales como células de levadura, células de insecto, células de plantas y células de mamífero, tales como células HEK293, células PerC6, células CHO, células COS o células HELA y sus derivados son preferidos. Particularmente preferidas son las líneas celulares de producción humana. Se prefiere que las células huésped transfectadas secreten el anticuerpo producido en el medio de cultivo. Si se logra la expresión intracelular, entonces la renaturalización se realiza de acuerdo con procedimientos estándar tales como por ejemplo, los descritos por Benetti et al., 1998.

Los anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con la invención se generan a partir de linfocitos de sangre de un paciente convaleciente y, por lo tanto, da como resultado anticuerpos refinados y seleccionados de forma natural con alta afinidad por la neutralización y protección eficaz contra infecciones.

La presente invención también proporciona métodos para producir el anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo monoclonal se produce cultivando el hibridoma descrito anteriormente. El anticuerpo monoclonal producido se secreta en el sobrenadante y se puede purificar a partir de él aplicando técnicas cromatográficas convencionales.

Alternativamente, el anticuerpo monoclonal se produce mediante la célula huésped que comprende un vector de acuerdo con la presente invención y cultivando la célula huésped bajo condiciones adecuadas para la expresión recombinante de la cadena de anticuerpo codificada. Preferiblemente, la célula huésped comprende al menos un ácido nucleico que codifica la cadena ligera y al menos un ácido nucleico que codifica la cadena pesada y es capaz de ensamblar el anticuerpo monoclonal de tal manera que se genera una estructura tridimensional que es equivalente a la estructura tridimensional de un anticuerpo monoclonal producido por un mamífero, preferiblemente una célula B humana. Si la cadena ligera se produce por separado de la cadena pesada, entonces ambas cadenas pueden purificarse y posteriormente ensamblarse para producir un anticuerpo monoclonal que tiene esencialmente la estructura tridimensional de un anticuerpo monoclonal producido por un mamífero, preferiblemente una célula B humana.

El anticuerpo monoclonal también se puede obtener por expresión recombinante de la cadena ligera y/o pesada codificada en la que el ácido nucleico se produce aislando un ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal de manera conocida e injertando la secuencia de ácido nucleico que codifica las CDRs como se define en las reivindicaciones sobre el ácido nucleico aislado.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo monoclonal o los ácidos nucleicos de la invención como se define aquí y un portador o ingrediente farmacéuticamente aceptable.

Se divulgan adicionalmente aquí composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo monoclonal y/o al menos un ácido nucleico que codifica una cadena ligera y/o pesada del anticuerpo monoclonal.

La composición farmacéutica puede comprender además fármacos antibióticos tales como estreptomina, penicilina y vancomicina, etc., preferiblemente acoplados al anticuerpo monoclonal de la invención.

Las composiciones farmacéuticas comprenden el anticuerpo monoclonal en un intervalo de dosificación de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de cualquier manera conocida tal como administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, tópica, intranasal, o como aerosol por inhalación.

En una realización preferida de la invención, las composiciones farmacéuticas se usan para la profilaxis o el tratamiento de la formación de abscesos, en donde la formación de abscesos es causada por una infección por S. aureus en un órgano de un paciente mamífero, tales como ganado, cerdo, gatos, perros, caballos, humanos. En una

realización preferida de la invención, las composiciones farmacéuticas se aplican a pacientes humanos. Además, la infección por *S. aureus* a tratar con la composición farmacéutica de la invención puede ser, por ejemplo, una infección de la mama, tal como mastitis.

5 Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal o el ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena ligera y la cadena pesada como se define aquí para usar en la profilaxis o tratamiento de una formación de abscesos en un órgano en un paciente mamífero, preferiblemente humano.

10 Las composiciones farmacéuticas, el anticuerpo monoclonal o el ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena ligera o la cadena pesada como se define aquí se aplican para la profilaxis o tratamiento de una formación de absceso en un órgano, tal como riñón, corazón, hígado, vesícula biliar, páncreas, intestino delgado, intestino grueso, pulmón, cerebro, piel, ojo, tejido linfático o bazo. En una realización preferida de la invención, el absceso a tratar es un absceso abdominal. En consecuencia, el órgano abdominal que se tratará es el hígado, la vesícula biliar, el bazo, el páncreas, el intestino delgado, los riñones y el intestino grueso.

15 El término "formación de abscesos" como se usa aquí se refiere a la formación de un absceso en un órgano, como riñón, corazón, hígado, vesícula biliar, páncreas, intestino delgado, intestino grueso, pulmón, cerebro, piel, ojo, tejido linfático o bazo. El término "absceso" como se usa aquí significa una recopilación de pus que se ha acumulado en una cavidad formada por el tejido sobre la base de un proceso infeccioso (generalmente causado por bacterias o parásitos). Las toxinas liberadas por estas bacterias multiplicadoras destruyen las células y desencadenan una respuesta inflamatoria, que atrae grandes cantidades de glóbulos blancos al área y aumenta el flujo sanguíneo regional. Estos leucocitos descomponen los tejidos muertos y absorben las bacterias por medio de la fagocitosis. El pus espeso verde o amarillento se forma a partir de los tejidos descompuestos, las bacterias muertas y los leucocitos, y el fluido extracelular que se ha acumulado. Un absceso se caracteriza por la encapsulación de una pared de absceso que está formada por las células sanas adyacentes en un intento de evitar que el pus infecte las estructuras vecinas. Es una reacción defensiva del tejido para evitar la propagación de materiales infecciosos a otras partes del cuerpo. Los abscesos pueden ocurrir en cualquier tipo de tejido sólido, pero con mayor frecuencia en la superficie de la piel (donde pueden ser pústulas superficiales (forúnculos) o abscesos profundos de la piel), en los pulmones, el cerebro, los riñones y las amígdalas. Las principales complicaciones son la diseminación del material del absceso, como la siembra de órganos en tejidos adyacentes o remotos y la extensa muerte regional del tejido (gangrena). La formación de abscesos se detecta mediante la evaluación de la carga bacteriana dentro del órgano.

20 El término "absceso abdominal" como se usa aquí se refiere a un absceso en un órgano de la cavidad abdominal. La cavidad abdominal es la cavidad del cuerpo que contiene la mayor parte de las vísceras y que se encuentra debajo (o inferior a) la cavidad torácica y sobre la cavidad pélvica. Es una parte de la cavidad abdominopélvica. Los órganos de la cavidad abdominal incluyen el estómago, el hígado, la vesícula biliar, el bazo, el páncreas, el intestino delgado, los riñones y el intestino grueso.

25 La "siembra de órganos" tal como se usa aquí significa la diseminación de bacterias vivas desde el sitio local de infección a tejidos y órganos distantes. La siembra de órganos se caracteriza por la presencia de células bacterianas infectivas vivas en tejido sano sin formación de colonias macroscópicas encapsuladas de células bacterianas.

30 "Carga bacteriana" como se usa aquí se define como la cantidad de células bacterianas vivas dentro de un tejido anatómico bien definido expresado como la cantidad de células bacterianas que crecen en colonias en medios de crecimiento sólidos, tales como placas de agar. Con el fin de evaluar la carga bacteriana dentro de un órgano, el órgano se extrae quirúrgicamente del tejido circundante y el tejido del órgano se tritura bajo condiciones estériles en solución salina estéril para destruir la organización bien estructurada del tejido y separar las células bacterianas del tejido de mamífero. Una cantidad definida de suspensión celular (o diluciones en serie de las mismas en solución salina estéril) se extiende sobre medios sólidos de crecimiento bacteriano. La carga bacteriana se expresa como "unidades formadoras de colonias" por riñón (por ejemplo, cfu/riñón).

35 La presente invención también proporciona un kit de prueba para el diagnóstico de infecciones por *S. aureus* que comprende al menos un anticuerpo monoclonal de la presente invención y, opcionalmente, otros ingredientes adecuados para llevar a cabo una prueba de diagnóstico.

40 Los ingredientes adecuados para llevar a cabo una prueba de diagnóstico son, por ejemplo, una solución reguladora con una osmolalidad dentro de un intervalo de 280-320 mOsm/litro y un valor de pH dentro de un intervalo de pH 6-8; una solución reguladora que contiene agentes quelantes; una solución reguladora que contiene cationes monovalentes o bivalentes con la concentración de catión total de la composición reguladora que varía desde aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 2,0 M; y/o una solución reguladora que contiene suero derivado de animales o humanos a una concentración entre 0,01% y 20%.

45 El kit de prueba es adecuado para el diagnóstico específico confiable de una infección por *S. aureus*. Un ensayo de prueba puede basarse en una prueba de ELISA convencional en forma líquida o enlazada a la membrana. La detección puede ser directa o indirecta, como se conoce en la técnica, en la que el anticuerpo está conjugado opcionalmente a un marcador enzimático, fluorescente o radioactivo.

Se divulga adicionalmente aquí el uso de al menos un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención para detectar el enlace a la toxina alfa en una muestra. El enlace del anticuerpo de acuerdo con la invención a la toxina alfa se puede detectar, por ejemplo, con anticuerpo secundario de cabra anti IgG humana conjugada con HRP.

5 Breve descripción de las figuras

Figura 1

10 La Figura 1 muestra el ADN y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 243-4. La región CDR1 de 243-4 está en las posiciones 26 a 33, la región CDR2 de 243-4 está en las posiciones 51 a 58, y la región CDR3 de 243-4 está en las posiciones 97 a 110.

Figura 2

15 La Figura 2 muestra el ADN y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 243-4. La región CDR1 de 243-4 está en las posiciones 26 a 33, la región CDR2 de 243-4 está en las posiciones 51 a 53, y la región CDR3 de 243-4 está en las posiciones 90 a 101.

Figura 3

20 La Figura 3 muestra la especificidad del antígeno del anticuerpo monoclonal humano 243-4. La especificidad antigénica del anticuerpo 243-4 se evaluó enlazándose a un panel de toxinas bacterianas en un ensayo ELISA. ELISA se realizó en placas de microtitulación recubiertas con toxinas purificadas. Después de una incubación durante la noche a temperatura ambiente, las placas de microtitulación se bloquearon con BSA y se detectó el enlace de mAb 243-4 a toxinas inmovilizadas con anticuerpo secundario de IgG de cabra antihumano conjugado con HRP. El enlace del anticuerpo monoclonal humano 243-4 a la toxina alfa de *S. aureus* está claramente favorecida con respecto al enlace a todas las otras toxinas probadas.

Figura 4

30 La Figura 4 muestra el enlace del anticuerpo monoclonal humano 243-4 a la toxina alfa de cepas epidémicas de *S. aureus* en experimentos de inmunoprecipitación Western. La producción de toxinas alfa de doce cepas *S. aureus* epidémicas se controló a partir de cultivos bacterianos en la fase de crecimiento estacionario. Después del cultivo, los sobrenadantes bacterianos normalizados y la toxina alfa purificada se cargaron en un gel de SDS-PAGE y se aplicaron a la electrotransferencia. Después de bloquear la membrana de nitrocelulosa se incubó con el anticuerpo monoclonal humano purificado 243-4. La producción y el reconocimiento tanto de la toxina alfa monomérica como de la heptamérica de cada cepa epidémica evaluada se demostró mediante el enlace del anticuerpo monoclonal humano 243-4.

40 En la Figura 4, M significa tamaño de marcador, los números 1-12 son cepas epidémicas de *S. aureus* y α Tox es una toxina alfa purificada.

Figura 5

45 La Figura 5 muestra la determinación de afinidad del anticuerpo monoclonal humano 243-4 por BIAcore. La cinética de enlace del anticuerpo monoclonal humano 243-4 se analizó usando un instrumento BIAcore 2000. Se aplicaron diferentes concentraciones de toxina alfa a una célula de flujo inmovilizada con mAb 243-4. Se registraron las fases de asociación y disociación para calcular la constante de disociación del anticuerpo. Los datos cinéticos se evaluaron mediante ajuste global utilizando el software BIAevaluation 4.1.

50

Figura 6

55 La Figura 6 muestra la neutralización de la toxina alfa por el anticuerpo monoclonal humano 243-4 en un modelo de cultivo de tejido de lesión de célula alveolar humana. Las células epiteliales alveolares humanas A549 se cocultivaron durante 16 h con la toxina alfa en presencia de anticuerpo de control de isotipo o anticuerpo monoclonal 243-4. Después de ese tiempo, las células se analizaron mediante el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH), que proporciona una lectura de la lesión celular causada por la toxina alfa y revela el grado de protección que se puede lograr con los anticuerpos aplicados. Para la interpretación de los resultados, el grado de lisis celular, que resultó de la preincubación con la concentración más alta de toxina alfa, se estableció en 100%. Las células tratadas con toxina solo mostraron una titulación de lisis en dependencia de la concentración de toxina alfa aplicada. Se observó la misma titulación cuando la toxina alfa se preincubó con el anticuerpo control de isotipo, lo que indica que no hay efecto protector del control del isotipo. Por el contrario, las células epiteliales alveolares humanas se protegieron de la lisis dependiente de la toxina alfa mediante incubación con anticuerpo monoclonal humano 243-4. El experimento se realizó en tres ocasiones independientes, cada una de las cuales confirmó la protectividad del anticuerpo 243-4.

65

Figura 7

La Figura 7 muestra el efecto protector del anticuerpo monoclonal humano 243-4 en un modelo de ratón relacionado con un catéter venoso central de infección de órganos múltiples. Veinticuatro horas después de la colocación del catéter, los ratones recibieron 1×10^7 CFU de *S. aureus* cepa US300 y 7,5 mg/kg de mAb 243-4 o PBS a través del catéter. Dos días más tarde, los ratones del grupo de tratamiento recibieron una segunda dosis de anticuerpo (5 mg/kg), mientras que los ratones del grupo de control recibieron solo PBS. Cinco días después de la cirugía, se sacrificó a los ratones para controlar la carga bacteriana de los riñones y la formación de abscesos renales. Los ratones inmunizados con el anticuerpo monoclonal 243-4 mostraron una fuerte reducción de la carga bacteriana y no se observó formación de abscesos renales, mientras que todos los ratones de control poseían una alta carga renal bacteriana y una fuerte formación de abscesos.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, pero no están destinados a limitar el alcance de la presente invención. Otras realizaciones serán evidentes para las personas experimentadas en la técnica al estudiar la especificación y teniendo en cuenta los conocimientos generales comunes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Secuencias de ADN y aminoácidos de 243-4

La especificidad del anticuerpo está determinada por la secuencia de ADN y de aminoácidos, respectivamente. Se determinaron las secuencias de ADN de los fragmentos variables de las cadenas pesada y ligera.

Para el aislamiento de ARN, las células de hibridoma 5×10^5 se sedimentaron mediante centrifugación y se homogeneizaron usando columnas Qiasredder (no.79654, Qiagen). Luego se aisló el ARNm de pellas celulares de hibridoma homogeneizadas utilizando el RNeasy-Kit (no.74124, Qiagen) de acuerdo con el manual de instrucciones del proveedor. Construido sobre ARNm aislado, el ADNc se sintetizó mediante transcripción inversa usando la transcriptasa inversa Superscript II (no.18064-022, Invitrogen). Los genes del anticuerpo 243-4 se amplificaron a partir de ADNc sintetizado usando el kit Advantage 2 PCR (no.639206, Clontech) de acuerdo con el manual de instrucciones del proveedor. La amplificación específica de los genes del anticuerpo se garantizó mediante la aplicación de combinaciones de cebadores diseñadas para la amplificación de genes de la región variable IgG reordenada humana (Welschof et al., 1995). Para la amplificación de los dominios de cadena pesada variable (VH) y los dominios de cadena ligera variable (VL), se utilizó un conjunto de cebadores directos específicos de cadena en combinación con un cebador inverso específicamente recocado en los dominios constantes de la cadena pesada o la cadena ligera (amplificación VH CH IgG en combinación con VH1, VH2 y VH3; amplificación VL CL λ en combinación con VL λ , 1, VL λ 2/5, VL λ , 3, VL λ , 4a, VL λ , 4b y VL λ , 6; ver tabla 1). A continuación, los amplificados de PCR se clonaron en el plásmido pCR4-TOPO del Kit de Clonación TOPO TA para Secuenciación (#K457540, Invitrogen) y finalmente se envió el ADN de plásmido purificado para secuenciación (Microsynth, Balgach, Suiza) utilizando los cebadores específicos de plásmido del kit de clonación TOPO (T3 y T7, ver tabla 1). Las secuencias de ADN obtenidas se procesaron y alinearon usando el paquete de software de gestión de clones (no.875-501-1787, Scientific & Educational Software). Como resultado de las alineaciones realizadas, se definió una secuencia consenso y posteriormente se analizó utilizando la base de datos V Base de todas las secuencias de la región variable de la línea germinal humana (http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/share/textes/). Con base en los resultados iniciales de la secuenciación, secuencias de cebador internas específicas de cadena adicionales (VL-atox as y VH-atox as, ver la Tabla 1) se diseñaron y aplicaron para confirmar la secuencia de anticuerpo identificada en las regiones de recocido de las combinaciones de cebadores que se usaron anteriormente. Los genes del anticuerpo así generados se aplicaron a la secuenciación como se describió anteriormente, como se muestra en las Figuras 1 y 2.

Tabla 1

Secuencias de cebador utilizadas para la amplificación y secuenciación de dominios variables de anticuerpo 243-4				
Cebador	Fuente	SEQ ID NO	Secuencia (5'-3')	Aplicación
CH IgG	Welschof <i>et al.</i> , J Immunol Met, 179, 1995	9	GAC C(G ⁵⁰)GA TGG GCC CTT GGT GGA*	PCR, secuenciación

ES 2 651 762 T3

Secuencias de cebador utilizadas para la amplificación y secuenciación de dominios variables de anticuerpo 243-4				
Cebador	Fuente	SEQ ID NO	Secuencia (5'-3')	Aplicación
VH1		10	C(G ⁵⁰)AG GTG CAG CTG GTG CAG TCT*	PCR, secuenciación
VH2		11	CAG GTG(A ⁵⁰) CAG CTG CAG G(C ⁵⁰)AG TC*	PCR, secuenciación
VH3		12	GAG GTG CAG CTG G(T ⁵⁰)TG GAG TCT*	PCR, secuenciación
CLλ		13	AGA GGA G(C ⁵⁰)GG GAA CAG AGT GAC*	PCR, secuenciación
VLλ 1		14	CAG TCT GTG T(C ⁵⁰)TG ACG(T ⁵⁰) CAG CCG CCC TCA*	PCR, secuenciación
VLλ 2/5		15	CAG TCT GCG CTG ACT CAA(G ⁵⁰) CCG G(C ⁵⁰)CC TCT*	PCR, secuenciación
VLλ 3		16	TCC TAT GAA CTG ACT CAG CCA CCC(T ⁵⁰) T	PCR, secuenciación
VLλ 4a		17	TCT GAA CTG ACT CAG CCG(A ³³ T ³³) C(G ⁵⁰)CC TC*	PCR, secuenciación

Secuencias de cebador utilizadas para la amplificación y secuenciación de dominios variables de anticuerpo 243-4				
Cebador	Fuente	SEQ ID NO	Secuencia (5'-3')	Aplicación
VLλ 4b		18	TCT GAA CTG ACT CAG GAC CCT GC(T ⁵⁰)T*	PCR, secuenciación
VLλ 6		19	A(G ⁵⁰)AT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CAC TCT*	PCR, secuenciación
T3	#K457540	20	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA	secuenciación
T7	Invitrogen	21	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	secuenciación
VL-atoxas		22	AGG CTG TCA TCC CAT GTT GCA CAG	PCR, secuenciación
VH-atoxas	Diseño interno	23	CTG CTG CTC CCA GAT CGT CTC GC	PCR, secuenciación

* Las bases entre paréntesis representan sustituciones en la posición anterior y el número indica el porcentaje al que los nucleótidos están sustituidos.

Ejemplo 2

5 Especificidad de antígeno del anticuerpo monoclonal humano 243-4 (ELISA)

La especificidad antigénica del anticuerpo 243-4 se evaluó mediante el enlace a un panel de toxinas bacterianas (toxina alfa: no.120, List Biological Laboratories; todas las demás toxinas: producción interna, Kenta Biotech AG) en un ensayo ELISA. El ELISA se realizó en placas de microtitulación (no.439454, Nunc MaxiSorp) recubiertas con toxinas purificadas a una concentración de 1 µg/ml cada una. Después de una incubación durante la noche a temperatura ambiente, las placas de microtitulación se bloquearon durante 2 horas con BSA al 0,5% y se detectó el enlace de mAb 243-4 (1 µg/ml) a toxinas inmovilizadas con anticuerpo secundario IgG de cabra antihumano conjugado con HRP a dilución 1:2.000 (no.62-8420, Zymed Laboratories, Invitrogen). Las reacciones se detuvieron con HCl.

15 La densidad óptica se leyó en un lector de ELISA a 490 nm usando el software Softmax Pro®, como se muestra en la Figura 3.

Ejemplo 3

20 Enlace a la toxina alfa de cepas epidémicas de *S. aureus* en experimentos de inmunoprecipitación Western

La producción de alfa-toxina de doce cepas epidémicas de *S. aureus* se controló después de 16 horas de crecimiento en medio BHI (no.255003, Becton Dickinson) a 37 °C. Las cepas se obtuvieron del centro de referencia alemán *S. aureus* (Instituto Robert Koch, Wernigerode) y representan las cepas epidémicas más prevalentes que causan actualmente infecciones por *S. aureus*. Algunas de estas cepas producen menos toxina alfa en comparación con otras que dan como resultado una potencia de señal diferente.

30 Los diferentes genotipos de las cepas evaluadas se representan en la Tabla 2. Después del cultivo, las bacterias se sedimentaron mediante centrifugación y los sobrenadantes del cultivo se normalizaron a OD₆₀₀= 0,6 de los cultivos bacterianos iniciales. Se cargaron 25 µl de cada sobrenadante en un gel SDS-PAGE al 4-20% (no.EC60252, Invitrogen) seguido de electrotransferencia durante 1 hora. Se cargó un µg de toxina alfa purificada (no.120, List

Biological Laboratories) y se transfirió en paralelo como referencia. Después de bloquear con 5% de leche en polvo durante 1 hora, la membrana de nitrocelulosa (no.LC2000, Invitrogen) se incubó con 50 µg/ml de anticuerpo monoclonal humano purificado 243-4. El enlace del anticuerpo 243-4 a la toxina alfa finalmente se detectó con anticuerpo secundario IgG de cabra antihumano conjugado con HRP a una dilución 1:2.000 (no.62-8420, Zymed Laboratories, Invitrogen, como se muestra en la Figura 4).

Tabla 2

Panel de cepas adquiridas del hospital y la comunidad de <i>S. aureus</i> resistentes a la meticilina (MRSA) de líneas clonales representativas				
Designación de inmunoprecipitación Western	Número del aislado del Instituto Robert Koch	Tipo MLS ¹	CC ²	Tipo de secuencia Spa ³
1	93-00134	ST247	8	t051
2	06-00842	ST8	8	t008
3	06-02222	ST9	8	t008
4	06-01579	ST239	8	t031
5	06-00219	ST5	5	t002
6	06-00409	ST225	5	t003
7	06-01019	ST45	45	t1384
8	06-02182	ST22	22	t965
9	03-02773	ST1	1	t175
10	06-00373	ST8	8	t008
11	05-01089	ST22	22	t310
12	06-00300	ST80	80	t044
*1) tipificación de secuencia de múltiples locus				
*2) complejo clonal				
*3) Análisis de la región repetida variable del gen de la proteína A (spa)				

10

Ejemplo 4

Determinación de afinidad (por BIAcore)

15 La resonancia de plasmón superficial se midió usando un instrumento BIAcore 2000 (BIAcore). Todos los experimentos se realizaron en regulador Mops 20 mM, pH 7,0, 150 mM de NaCl y 0,1 mg/ml de BSA. Primero, se inmovilizó IgG antihumana de cabra (no.81-7100, Zymed Laboratories, Invitrogen) en un chip CM5 (BIAcore) a aproximadamente 13.200 RU por acoplamiento de amina como se describe en el manual de aplicaciones BIA. Además del recubrimiento covalente inicial, el anticuerpo 243-4 se enlazó al chip sensor mediante la interacción con

20 el anticuerpo IgG antihumano preimmobilizado, produciendo finalmente un nivel de inmovilización adicional de aproximadamente 240 RU. Para la caracterización cinética de los pulsos de interacción antígeno-anticuerpo de concentraciones crecientes de toxina alfa (3,9 nM, 7,8 nM, 15,62 nM, 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM y 500 nM; no. 120, List Biological Laboratories) inyectado a una rata de flujo de 50 µl/min. Después de cada ciclo de medición (5 minutos de asociación seguido de 30 minutos de disociación) el complejo anticuerpo-antígeno se resolvió por

25 regeneración de la superficie con 10 mM de glicina-HCl a pH 1,7. Para el cálculo de la constante de disociación del anticuerpo 243-4, las fases de asociación y disociación se registraron y evaluaron mediante ajuste global utilizando el software BIAevaluation 4.1 (BIAcore AB, como se muestra en la Figura 5). Para el análisis de ajuste global, solo se tuvieron en cuenta estas concentraciones de antígeno, lo que permitió el análisis siguiendo el modelo de enlace Langmuir 1:1 (≤ 125 nM, Tabla 2) y como se resalta en el manual BIAcore.

30

Tabla 3

Constantes cinéticas de la interacción cuantitativa toxina alfa-anticuerpo 243-4			
Concentración de antígeno	k_{ass} ($\text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{diss} (s^{-1})	K_D (en M)
3,9 nM	$5,7 * 10^4$	$8,2 * 10^{-5}$	$1,4 * 10^{-9}$
7,8 nM	$6,1 * 10^4$	$1,0 * 10^{-5}$	$1,6 * 10^{-9}$
15,62 nM	$6,2 * 10^4$	$8,0 * 10^{-5}$	$1,3 * 10^{-9}$
31,25 nM	$6,3 * 10^4$	$9,7 * 10^{-5}$	$1,5 * 10^{-9}$
62,5 nM	$6,6 * 10^4$	$9,0 * 10^{-5}$	$1,4 * 10^{-9}$
125 nM	$6,2 * 10^4$	$8,9 * 10^{-5}$	$1,4 * 10^{-9}$
Valor medio	$6,2 * 10^4 \pm 0,3 * 10^4$	$8,9 * 10^{-5} \pm 0,7 * 10^{-5}$	$1,4 * 10^{-9} \pm 0,1 * 10^{-9}$

5 Ejemplo 5

Modelo de cultivo tisular de lesión de célula alveolar humana

10 Se cultivaron en placa células epiteliales alveolares humanas A549 en medio RPMI (no.R0883, Sigma-Aldrich) a una densidad de 3×10^5 células por pozo. En concentraciones paralelas crecientes de toxina alfa (5 $\mu\text{g/ml}$ -50 $\mu\text{g/ml}$; no.120, List Biological Laboratories) se preincubaron solo con medio, 20 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo de control de isotipo (lambda IgG1 humana, proteína de mieloma purificada; no.I 5029, Sigma-Aldrich) o 20 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo monoclonal purificado 243-4. Después de 4 horas de incubación a 37 °C, se añadieron soluciones de toxina alfa o toxina alfa-anticuerpo a las células y se continuó la incubación durante 16 horas adicionales. Después de ese tiempo, las células se analizaron mediante el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) (no.04744934001, Roche), que proporciona una lectura de la liberación de LDH celular en el medio de cultivo, como se muestra en la Figura 6.

Ejemplo 6

20 Modelo de ratón de infección de órganos múltiples

25 Ratones hembra Balb/c (Charles River, Sulzfeld, Alemania), que pesaban 27-31 g, se aclimataron durante 14 días antes de la cirugía. Los ratones se obtuvieron del proveedor especificado como libre de patógenos. Para la colocación del catéter, los ratones fueron anestesiados intraperitonealmente con xilazina (8 mg/kg de peso corporal)/ketamina (100 mg/kg de peso corporal). Se realizó una incisión horizontal mínima en la piel en el lado izquierdo del cuello afeitado para colocar el catéter de polietileno de una sola luz (diámetro exterior 0,6 mm, Föhr Medical Instruments, Seeheim, Alemania) en la vena cava superior. Veinticuatro horas después de la colocación del catéter, los ratones recibieron 1×10^7 CFU de la cepa US300 de *S. aureus* (en 100 μl) y 7,5 mg/kg de mAb 243-4 purificado o PBS (en 50 μl) a través del catéter. Dos días más tarde, los ratones del grupo de tratamiento recibieron una segunda dosis de anticuerpo (5 mg/kg), mientras que los ratones del grupo de control recibieron solo PBS.

35 Cinco días después de la cirugía, se sacrificó a los ratones para controlar la carga bacteriana de los riñones y la formación de abscesos renales. Por esa razón, los riñones se recolectaron asépticamente de animales sacrificados y se homogeneizaron en solución salina. Antes de la extracción del órgano, se confirmó la ubicación del catéter en la vena cava superior y, antes de la homogeneización renal, se examinaron macroscópicamente los órganos para determinar la formación de abscesos. Finalmente, se cultivaron diluciones en serie de los homogenizados de órganos en placas MPK durante al menos 48 horas a 37 °C. Las unidades formadoras de colonias (CFU) se calcularon y documentaron como CFU/riñón, como se muestra en la Figura 7.

Tabla 4

Formación de abscesos renales diferenciales en animales de grupo de tratamiento y control		
Grupo de Tratamiento MAb	Ratón 1	No hay formación de abscesos en ambos riñones
	Ratón 2	No hay formación de abscesos en ambos riñones
	Ratón 3	No hay formación de abscesos en ambos riñones
Grupo Control	Ratón 4	Fuerte formación de abscesos en ambos riñones
	Ratón 5	Fuerte formación de abscesos en ambos riñones
	Ratón 6	No se determinó ya que el ratón murió antes del final del experimento

5 Referencias

- Adlam C. et al., 1977: Effect of Immunization with Highly purified Alpha- and Beta-Toxins on Staphylococcal Mastitis in Rabbits. *Infect and Immun.* 17: 250-256.
- 10 Altschul S. et al., 1990: Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403.
- Benetti P.H. et al., 1998: Expression and characterization of the recombinant catalytic subunit of casein kinase II from the yeast *Yarrowia lipolytica* in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* (13):283-290.
- 15 Corbin B.D. et al., 2008: Meta! Chelation and Inhibition of Bacterial Growth in Tissue Abscesses ; *Science* 319, 962-965.
- DeLeo F.R. and Otto M., 2008: An antidote for *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J Exp Med* 05(2): 271-274.
- 20 Devereux J et al., 1984: A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX *Nucleic Acids Research* 12 (12): 387.
- Goode R.L., Baldwin J.N., 1974: Comparison of purified alpha-toxins from various strains of *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol.* 28(1):86-90.
- 25 Henikoff S. and Henikoff J.G., 1992: Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992 Nov 15;89(22):10915-9.
- 30 Heveker N. et al., 1994a: A human monoclonal antibody with the capacity to neutralize *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Hum. Antibod. Hybridomas* 5: 18-24.
- Heveker N. et al., 1994b: Characterization of Neutralizing monoclonal Antibodies directed against *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Hybridoma* 13: 263-270.
- 35 Kapral F.A. et al., 1980. Formation of Intraperitoneal Abscesses by *Staphylococcus aureus*. *Infect and Immun.* 30: 204-211.
- Kielian T. et al., 2001: Diminished Virulence of an Alpha-Toxin Mutant of *Staphylococcus aureus* in Experimental Brain Abscesses; *Infect and Immun.* (69), 6902-6911.
- 40 Levine MM. et al., 1983: New Knowledge on Pathogenesis of Bacterial Enteric Infections as Applied to Vaccine Development. *Microbiol. Reviews* (47), 510-550.
- 45 McElroy MC et al., 1999: Alpha-toxin damages the air-blood barrier of the lung in a rat model of *Staphylococcus aureus* induced pneumonia. *Infect and Immun* 67, 5541-5544.
- Needleman S.B. Wunsch C.D., 1970: A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48: 443.

Persic L. et al., 1997: An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. *Gene* 10;187(1):9-18.

5 Schwan W.R. et al., 2003: Loss of hemolysin expression in *Staphylococcus aureus* agr mutant correlates with selective survival during mixed infections in murine abscesses and wounds. *FEMS Imm and Med Microbiol* 28, 23-28.

Tzianabos A.O. et al., 2001: Structural rationale for the modulation of abscess formation by *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *PNAS* 98: 9365-9370.

10 Von Köckrick-Blickwede M. et al.,2008: Immunological Mechanisms Underlying the Genetic Predisposition to Severe *Staphylococcus aureus* Infection in the Mouse Model. *The American Journal of Pathology* 173 (6), 1657-1668.

Wardenburg, J.B., and Schneewind O. 2008: Vaccine protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J. Exp. Med.* 205:287.-294.

15 Wardenburg, J.B. et al., 2007: Poring over pores: alpha-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nat. Med.* 13:1405-1406.

Welschof M. et al.; 1995: Amino acid sequence based PCR primers for amplification of rearranged human heavy and light chain immunoglobulin variable region genes. *J Immunol Methods.* 179(2):203-14.

20 Documento WO2007/145689 Uso de la toxina alfa para el tratamiento y la prevención de las infecciones por Estafilococo.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Aridis Pharmaceuticals, Inc.

<120> Anticuerpo monoclonal humano contra la toxina alfa derivada de *S. aureus* y su uso en el tratamiento o

30 prevención de la formación de abscesos

<130> EP65303IIHV200pau

<140> 14195810.8

35 <141> 2010-08-10

<150> 10743037.3

<151> 2010-08-10

40 <150> PCT/EP2010/004884

<151> 2010-08-10

<150> 09010311.0

45 <151> 2009-08-10

<150> 61/266,330

<151> 2009-12-03

50 <160> 25

<170 > versión Patenteln 3,3

<210> 1

<211> 8

55 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica_misc

60 <223> cadena ligera CDR1

<400> 1

Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr
1 5

ES 2 651 762 T3

<210> 2
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> característica_misc
 <223> cadena ligera CDR2
 10
 <400> 2
 Thr Asn Asn
 1
 15
 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <220>
 <221> característica_misc
 <223> cadena ligera CDR3
 <400> 3
 25
 Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Leu Tyr Val
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <220>
 <221> misc_característica
 <223> cadena ligera CDR1
 35
 <400> 4
 Gly Tyr Lys Phe Gly Thr His Trp
 1 5
 40
 <210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <220>
 <221> misc_característica
 <223> cadena pesada CDR2
 50
 <400> 5
 Ile His Pro Ala Asp Ser Glu Thr
 1 5
 55
 <210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60
 <220>
 <221> misc_característica
 <223> cadena pesada CDR3

ES 2 651 762 T3

<400> 6

Ala Arg Arg Ser Gly Ser Ser Ser Trp Tyr Ala Leu Asp Phe
 1 5 10

5 <210> 7
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> misc_característica
 <223> cadena ligera de región variable

<400> 7

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

20 <210> 8
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <221> misc_característica
 <223> cadena pesada de región variable

<400> 8

ES 2 651 762 T3

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

5 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> PCR-cebador
 <400> 9
 gaccgatggg cccttggtgg a 21

 15 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> PCR-cebador
 <400> 10
 caggtgcagc tgggcagtc t 21

 25 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> PCR-cebador
 <400> 11
 caggtgcagc tgcaggagtc 20

 35 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> PCR-cebador
 <400> 12
 gaggtgcagc tggggagtc t 21
 45

<210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> PCR-cebador
 <400> 13
 10 agaggagggg aacagagtga c 21
 <210> 14
 <211> 27
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> PCR-cebador
 20 <400> 14
 cagtctgtgt tgacgcagcc gccctca 27
 <210> 15
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> PCR-cebador
 30 <400> 15
 cagtctgcgc tgactcaacc ggcctct 27
 <210> 16
 <211> 25
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> PCR-cebador
 <400> 16
 tcctatgaac tgactcagcc accct 25
 45 <210> 17
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> PCR-cebador
 <400> 17
 55 tctgaactga ctcagccgcc ctc 23
 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> PCR-cebador
 <400> 18
 65 tctgaactga ctcaggacct tgct 24

<210> 19
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> PCR-cebador
 <400> 19
 10 aattttatgc tgactcagcc ccactct 27
 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador de secuenciación
 20 <400> 20
 attaaccctc actaaagga 20
 <210> 21
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador de secuenciación
 30 <400> 21
 taatacgact cactataggg 20
 <210> 22
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> PCR-cebador
 <400> 22
 aggctgtcat cccatgttgc acag 24
 45 <210> 23
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> PCR-cebador
 <400> 23
 55 ctgctgctcc cagatcgtct cgc 23
 <210> 24
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> cadena pesada de región variable de anticuerpo humano monoclonal 243-4
 <400> 24
 65

ES 2 651 762 T3

```

gaggtgcaga tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc cgggggaacc totgaagatc      60
tcctgtaagg gttctggata caagtttggc acccactgga tcggctgggt gcgccagagg      120
cccggaag gcctggagtg gatgggaatc atccatcctg ctgactctga aaccaagtac      180
agcccgtcat tccaaggcca ggtctctttc tcagccgaca agtccagcaa taccgcctac      240
ctacattgga gcaccctgag ggccctggac accgccatgt attactgtgc gagacgatct      300
gggagcagca gttggtatgc tcttgatttc tggggccaag ggacaatggt caccgtctct      360
tcagcctcca ccaagggccc atccgtc                                          387

```

<210> 25
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> cadena ligera de región variable de anticuerpo humano monoclonal 243-4

10

```

cagtctgtgc tgactcagtc accctcagcg tcggggaccc cggggcagag ggtcaccatc      60
tcttgttctg gaggcagctc caacatcggg agtaatactg taaattggta ccaacagttc      120
ccaggagcgg cccccaaact cctcatctat actaataatc agcggccctc aggggtccct      180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag      240
tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca acatgggatg acagcctaaa tggcctttac      300
gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc ctaggtcagc ccaaggccaa ccccactgtc      360
actctgttc                                                                369

```


REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal específico para la toxina alfa de *S. aureus*, en el que la región variable de la cadena ligera del anticuerpo comprende la SEQ ID NO:1 en la región CDR1, la SEQ ID NO:2 en la región CDR2 y la SEQ ID NO:3 en la región CDR3, y en el que la región variable de la cadena pesada del anticuerpo comprende la SEQ ID NO:4 en la región CDR1, la SEQ ID NO:5 en la región CDR2 y la SEQ ID NO:6 en la región CDR3, o un fragmento o muteína del mismo capaz de enlazar a la toxina alfa de *S. aureus*, en el que el fragmento es un fragmento Fab o F(ab')₂ o una mezcla de los mismos; y en el que la muteína no tiene más de 5 sustituciones conservativas, en el que una sustitución conservativa es la sustitución de un aminoácido que pertenece a un grupo físicoquímico particular con un aminoácido que pertenece al mismo grupo físicoquímico, en el que el anticuerpo, fragmento o su muteína es capaz de prevenir la formación de abscesos causados por una infección por *S. aureus*.
2. Anticuerpo monoclonal específico para la toxina alfa de *S. aureus*, en el que la región variable de la cadena ligera del anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:7 y la región variable de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8, o un fragmento Fab o F(ab')₂ de los mismos capaz de enlazar a la toxina alfa de *S. aureus*, o una variante de dicho anticuerpo capaz de enlazar a la toxina alfa de *S. aureus*, en el que la secuencia del aminoácido de la región variable de la cadena ligera de dicha variante del anticuerpo es al menos 95% idéntica a la SEC ID NO:7 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de dicha variante del anticuerpo es al menos 95% idéntico a la SEQ ID NO:8, en el que el anticuerpo o variante de este es capaz de prevenir la formación de abscesos provocada por una infección por *S. aureus*.
3. Anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.
4. Anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cadena ligera es del tipo lambda y/o la cadena pesada es del tipo IgG.
5. Anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo es terminalmente N, internamente o terminalmente C modificado; preferiblemente, la modificación se selecciona entre al menos uno de oligomerización, glicosilación o conjugación a un fármaco o un marcador.
6. Anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 obtenible a partir de una célula B de mamífero o un hibridoma obtenido por fusión de dicha célula B de mamífero con una célula de mieloma o heteromieloma.
7. Hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 6.
8. Ácido nucleico que codifica la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 6.
9. Vector que comprende los ácidos nucleicos que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la reivindicación 8; preferiblemente, el vector también comprende un promotor unido operativamente al ácido nucleico para facilitar la expresión del mismo.
10. Célula huésped aislada que comprende el vector de la reivindicación 9 o el ácido nucleico de la reivindicación 8.
11. Un método para producir el anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 6 que comprende cultivar el hibridoma de la reivindicación 7 bajo condiciones que permiten la secreción de un anticuerpo o cultivar la célula huésped de la reivindicación 10 bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo monoclonal.
12. Composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1 a 5 o los ácidos nucleicos de la reivindicación 8 y un portador o ingrediente farmacéuticamente aceptable.
13. Anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el ácido nucleico de la reivindicación 8 para uso en la profilaxis o tratamiento de una formación de absceso en un órgano, en el que la formación de absceso es causada por *S. aureus*.
14. Anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el órgano es riñón, corazón, hígado, pulmón, cerebro, piel o bazo.
15. Kit de prueba para el diagnóstico de una infección por *S. aureus* en una muestra que comprende al menos un anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o los ácidos nucleicos de la reivindicación 8.

Figura 1:

VH

GAG GTG CAG ATG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCG GGG GAA CCT CTG AAG
 Glu Val Gln Met Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Pro Leu Lys

ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AAG TTT GGC ACC CAC TGG ATC GGC TGG GTG CGC
 Ile Ser Cys Lys Gly Ser **Gly Tyr Lys Phe Gly Thr His Trp** Ile Gly Trp Val Arg
CDR1

CAG AGG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGA ATC ATC CAT CCT GCT GAC TCT GAA
 Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile **Ile His Pro Ala Asp Ser Glu**
CDR2

ACC AAG TAC AGC CCG TCA TTC CAA GGC CAG GTC TCT TTC TCA GCC GAC AAG TCC AGC
Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Ser Phe Ser Ala Asp Lys Ser Ser

AAT ACC GCC TAC CTA CAT TGG AGC ACC CTG AGG GCC TCG GAC ACC GCC ATG TAT TAC
 Asn Thr Ala Tyr Leu His Trp Ser Thr Leu Arg Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr

TGT GCG AGA CGA TCT GGG AGC AGC AGT TGG TAT GCT CTT GAT TTC TGG GGC CAA GGG
 Cys **Ala Arg Arg Ser Gly Ser Ser Ser Trp Tyr Ala Leu Asp Phe** Trp Gly Gln Gly
CDR3

ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCC GTC
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

Figura 2:

VL

CAG TCT GTG CTG ACT CAG TCA CCC TCA GCG TCG GGG ACC CCC GGG CAG AGG GTC ACC
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr

ATC TCT TGT TCT GGA GGC AGC TCC AAC ATC GGA AGT AAT ACT GTA AAT TGG TAC CAA
 Ile Ser Cys Ser Gly Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln
CDR1

CAG TTC CCA GGA GCG GCC CCC AAA CTC CTC ATC TAT ACT AAT AAT CAG CGG CCC TCA
 Gln Phe Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Asn Asn Gln Arg Pro Ser
CDR2

GGG GTC CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC CTG GCC ATC
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile

AGT GGG CTC CAG TCT GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGT GCA ACA TGG GAT GAC AGC
 Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser
CDR3

CTA AAT GGC CTT TAC GTC TTC GGA ACT GGG ACC AAG GTC ACC GTC CTA GGT CAG CCC
 Leu Asn Gly Leu Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro
CDR3

AAG GCC AAC CCC ACT GTC ACT CTG TTC
 Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe

Figura 3:

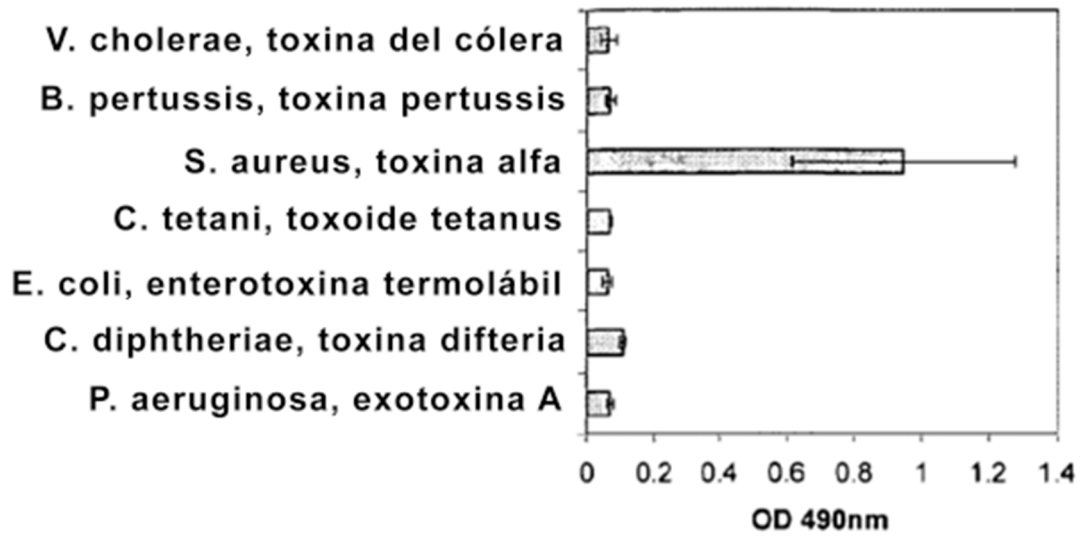


Figura 4:

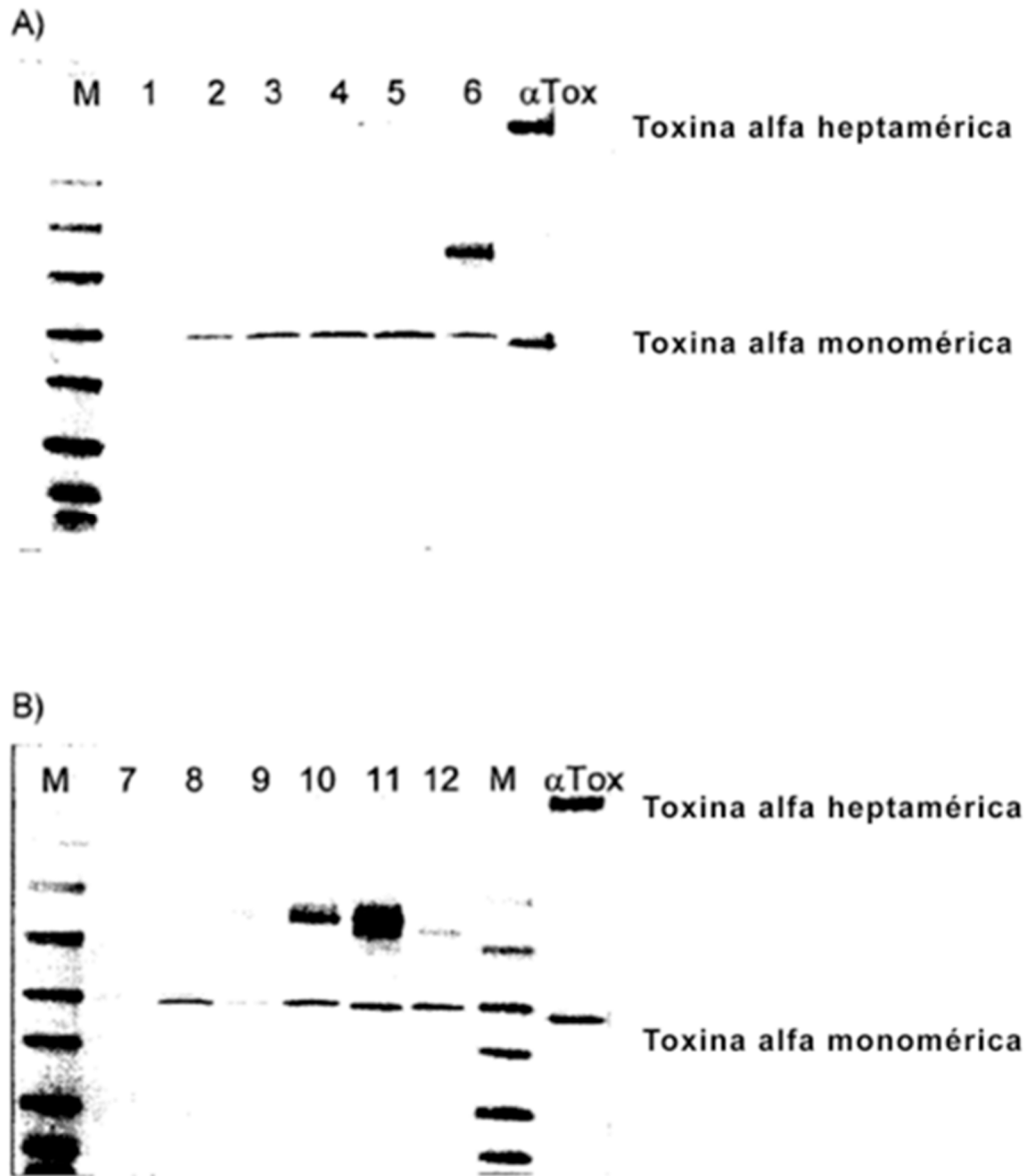


Figura 5:

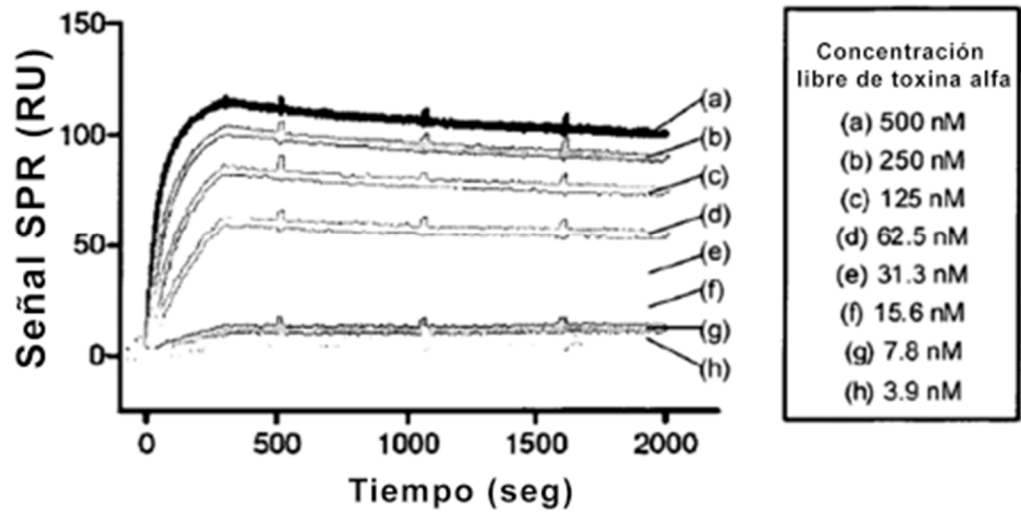


Figura 6:

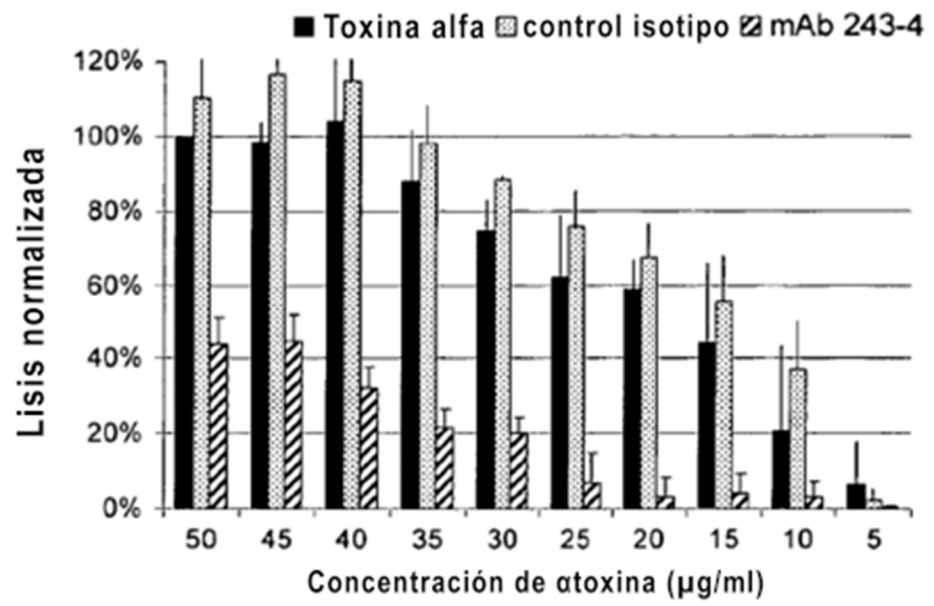


Figura 7:

