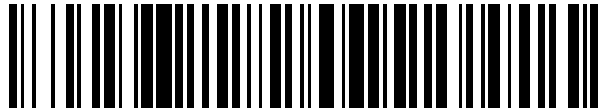


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 800**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2012 PCT/US2012/000328**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13015831**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2012 E 12817530 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2734229**

54 Título: **Métodos y composiciones para vacunar contra Staphylococcus aureusaureus**

30 Prioridad:

22.07.2011 US 201161510896 P

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

17.06.2019

73 Titular/es:

**NOVADIGM THERAPEUTICS, INC. (50.0%)
4201 James Ray Drive REAC 1 Building Suite
2200**

**Grand Forks, ND 58202, US y
LOS ANGELES BIOMEDICAL RESEARCH
INSTITUTE AT HARBOR-UCLA MEDICAL
CENTER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**YEAMAN, MICHAEL, R.;
EDWARDS, JOHN, E., JR.;
FILLER, SCOTT, G.;
IBRAHIM, ASHRAF, S;
FU, YUE y
HENNESSEY, JOHN, P., JR.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 716 800 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

Métodos y composiciones para vacunar contra *Staphylococcus aureus*

La presente invención se refiere a vacunas contra *Staphylococcus aureus*.

5 *Staphylococcus aureus* es la principal causa de infecciones cutáneas y de la estructura cutánea incluyendo celulitis y furunculosis, y está entre las causas más comunes de la bacteremia. Las cepas de *S. aureus* que exhiben fenotipo resistente a metilina (MRSA) son causas predominantes de infecciones adquiridas en hospitales y establecimientos sanitarios, incluyendo una enfermedad invasiva en hospedadores competentes inmunitarios, en la supresión inmunitaria (p. ej. neutropenia, trasplantes de órganos sólidos o médula ósea) y disfunciones inmunitarias hereditarias que manifiestan infección cutánea recurrente (p. ej., síndrome de Job, enfermedad granulomatosa crónica).

10 En este contexto, el documento WO 2006/121895 A2 describe una vacuna que incluye un miembro de la familia de proteínas Als aislado que tiene actividad de adherencia celular o uno de sus fragmentos.

15 El impacto significativo de MRSA sobre la salud pública es de especial interés a la luz de las altas tasas de mortalidad asociadas con enfermedad invasiva por *S. aureus* incluso con una terapia antimicrobiana adecuada (p. ej. 15-40% en la bacteremia y la endocarditis). Las tasas crecientes de infecciones potencialmente mortales y la sensibilidad decreciente a los antibióticos reclaman el desarrollo de una vacuna eficaz que se dirija a *Staphylococcus aureus*. Esta invención cumple esta necesidad.

20 La presente invención se refiere a los siguientes puntos:

1. Una vacuna que comprende de 30 a 300 µg de una proteína Als3 aislada que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato, pH 7, para el uso en un método de tratamiento de un absceso cutáneo que comprende una infección por *Staphylococcus aureus* en un mamífero.
- 25 2. La vacuna para el uso según el punto 1, en la que dicha *Staphylococcus aureus* es una cepa MRSA de *Staphylococcus aureus* o una cepa MSSA de *Staphylococcus aureus*.
3. La vacuna para el uso según el punto 1, en la que dicha *Staphylococcus aureus* es una cepa resistente a vancomicina (VRSA) o resistente a daptomicina (DRSA) de *Staphylococcus aureus*.
4. La vacuna para el uso según el punto 1, en la que dicha proteína Als3 está conjugada a un portador.
- 30 5. La vacuna para el uso según el punto 4, en la que dicho portador comprende hemocianina de lapa californiana (KLH), CRM197, toxoide de tétanos, toxoide de la difteria, fragmentos de enterotoxina B o complejo de la proteína de la membrana externa de *N. meningitides*.
6. La vacuna para el uso según el punto 4, en la que dicho portador es un fago, una levadura, un virus, un virosoma, o una partícula pseudoviral recombinante.
- 35 7. La vacuna para el uso según el punto 1, en donde dicha vacuna se administra mediante administración intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral o sublingual, o se administra para inhalación en una formulación en micropartículas.
8. La vacuna para el uso según el punto 1, en donde dicha vacuna comprende un adyuvante inmunoestimulante.
9. La vacuna para el uso según el punto 1, caracterizada por que la vacuna se formula para el uso con un antibiótico contra *Staphylococcus aureus*.
- 40

En general, se describe en la presente un método para vacunar a un mamífero contra *Staphylococcus aureus* que incluye las etapas de: a) identificar a un mamífero (p. ej., un ser humano o un mamífero no humano, tal como ganado, p. ej., una especie bovina, equina, porcina u ovina, o un mamífero doméstico, p. ej., un canino o felino) con riesgo de desarrollar una infección de la piel o los tejidos blandos por *Staphylococcus aureus*; y b) administrar a dicho mamífero una cantidad inmunogénica de una vacuna que incluye un polipéptido que comprende una proteína 3 de secuencia pseudoaglutinínica (Als) (Als3p) aislada, o uno de sus fragmentos inmunogénicos, en un medio farmacéuticamente aceptable. Polipéptidos ejemplares incluyen una Als3p de *Candida albicans* (por ejemplo, una Als3p mostrada en la Figura 1A, p. ej., SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o uno de sus fragmentos inmunogénicos). En

5 otras realizaciones, el polipéptido incluye el dominio N-terminal de Als3p de *Candida albicans* o uno de sus fragmentos inmunogénicos. El método divulgado en la presente es especialmente útil para la vacunación contra una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) de *S. aureus*. El método divulgado en la presente también es útil para la vacunación contra otras cepas de *S. aureus* resistentes a fármacos (p. ej. resistentes a vancomicina, resistentes a daptomicina, etc.), o *S. aureus* resistente a meticilina (MSSA) de *S. aureus*. En otras realizaciones, el polipéptido está conjugado a un portador tal como una hemocianina de lapa californiana (KLH), CRM197, toxoide del tétanos, toxoide de la difteria, fragmentos de enterotoxina B, complejo proteínico de la membrana externa de *N. meningitides* o cualquier otra proteína portadora usada en la técnica en vacunas conjugadas. Estos portadores también pueden incluir un fago, una levadura, un virus, un virosoma o una partícula pseudoviral recombinante. La vacuna, en general, se administra mediante administración intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral o sublingual, o se administra para inhalación en una formulación en micropartículas. Si se desea, la vacuna se administra como una dosis de recuerdo. Opcionalmente, la vacuna puede incluir un adyuvante inmunoestimulante. En otras realizaciones más, el método incluye administrar un antibiótico contra *S. aureus* en combinación con la vacuna, p. ej., en donde el antibiótico se coformula o coadministra con la vacuna.

15 En otro aspecto, se describe en la presente un método para vacunar a un mamífero (p. ej., un ser humano o un mamífero no humano, tal como ganado, p. ej., una especie bovina, equina, porcina u ovina, o un mamífero doméstico, p. ej., un canino o felino) contra *Staphylococcus aureus* que incluye las etapas de: a) identificar a un mamífero con riesgo de desarrollar una infección de la piel o los tejidos blandos por *Staphylococcus aureus*; y b) administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de una vacuna que incluye un polinucleótido (p. ej., un polinucleótido aislado) que codifica un polipéptido que incluye una Als3p, o uno de sus fragmentos inmunogénicos, incorporado en un vehículo de aporte adecuado, que podría incluir ADN o ARN mono- o bicatenario, un plásmido de ADN bicatenario o un vector viral, en un medio farmacéuticamente aceptable, en donde el polinucleótido se expresa *in vivo* y el mamífero genera una respuesta inmunitaria. La vacuna que contiene el polinucleótido provoca una respuesta inmunitaria en el mamífero, p. ej., la producción de anticuerpos anti-Als3p que exhiben especificidades para Als3p.

20 En otro aspecto más, se describe en la presente una proteína Als3 aislada, o uno de sus fragmentos inmunogénicos, para el uso en un método de tratamiento o prevención de una infección de la piel o los tejidos blandos por *Staphylococcus aureus* en un mamífero.

25 En otro aspecto, se describe en la presente una vacuna que incluye una proteína Als3 aislada, o uno de sus fragmentos inmunogénicos, para el uso en un método de tratamiento o prevención de una infección de la piel o los tejidos blandos por *Staphylococcus aureus* en un mamífero.

30 Esta Als3p útil para preparar proteínas aisladas o vacunas incluye las identificadas en *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*, así como las proteínas Als3p identificadas en búsquedas de bases de datos públicamente disponibles.

35 En otro aspecto más, se describe en la presente una proteína Als3 aislada, en donde la secuencia de aminoácidos de la proteína Als3 aislada consiste en SEQ ID NO: 2.

40 En otro aspecto más, se describe en la presente una composición farmacéutica que comprende una proteína Als3 aislada, en donde la secuencia de aminoácidos de la proteína Als3 aislada consiste en SEQ ID NO: 2, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

45 En otro aspecto más, se describe en la presente una vacuna que comprende una proteína Als3 aislada, en donde la secuencia de aminoácidos de la proteína Als3 aislada consiste en SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la proteína está conjugada a un portador tal como una hemocianina de lapa californiana (KLH), CRM197, toxoide del tétanos, toxoide de la difteria, fragmentos de enterotoxina B, complejo proteínico de la membrana externa de *N. meningitides* o cualquier otra proteína portadora usada en la técnica en vacunas conjugadas. Estos portadores también pueden incluir un fago, una levadura, un virus, un virosoma o una partícula pseudoviral recombinante. La vacuna, en general, se administra mediante administración intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral o sublingual, o se administra para inhalación en una formulación en micropartículas. Si se desea, la vacuna se administra como una dosis de recuerdo. La vacuna puede incluir opcionalmente un adyuvante inmunoestimulante. En otras realizaciones, la vacuna puede incluir una combinación de una proteína Als3 aislada y una o más de otras proteínas Als aisladas, p. ej., derivadas de una cepa de *Candida* seleccionada del grupo que consiste en *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*.

50 En otro aspecto, se describe en la presente una vacuna que incluye un polinucleótido (p. ej., un polinucleótido aislado) que codifica un polipéptido que incluye una Als3p, o uno de sus fragmentos inmunogénicos, incorporado en un vehículo de aporte adecuado, que podría incluir ADN o ARN mono- o bicatenario, un plásmido de ADN bicatenario o un vector viral, en un medio farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, una vacuna de polinucleótido de Als3 inmunogénico, p. ej., cuya secuencia de ácido nucleico contiene o consiste en SEQ ID NO: 3 en parte o en su totalidad, y que es adecuada para ser usada como una vacuna, se puede preparar, p. ej., a partir de un gen de Als3 o uno de sus fragmentos inmunogénicos. La vacuna puede incluir además un polinucleótido que codifica un

polipéptido inmunoestimulante que se coexpresa como la Als3p. Estas vacunas polinucleotídicas se pueden preparar como productos inyectables, p. ej., en soluciones o emulsiones líquidas fisiológicamente aceptables para la administración de polinucleótidos. El polinucleótido puede estar asociado con liposomas, tales como liposomas de lecitina u otros liposomas conocidos en la técnica, como un liposoma de ácido nucleico (por ejemplo, según se describe en la Publicación de Solicitud Internacional N^o WO 93/24640) o el polinucleótido puede estar asociado con un adyuvante. Los liposomas que incluyen lípidos catiónicos interactúan espontáneamente y rápidamente con polianiones, tales como ADN y ARN, dando como resultado complejos de liposoma/ácido nucleico que capturan hasta 100% del polinucleótido. Además, los complejos policatiónicos se fusionan con membranas celulares, dando como resultado un aporte intracelular de polinucleótido que sortea las enzimas degradativas del compartimento lisosómico. La Publicación de Solicitud Internacional N^o WO 94/27435 describe composiciones para inmunización genética que incluyen lípidos catiónicos y polinucleótidos. Se pueden usar ventajosamente agentes que ayudan a la captación celular de polinucleótidos, tales como iones calcio, proteínas virales, electroporación y otros agentes que facilitan la transfección. Las formas tanto líquidas como liofilizadas que se van a reconstituir incluyen, preferiblemente, tampones, en cantidades necesarias para ajustar adecuadamente el pH de la solución inyectada.

"Infección de la piel o los tejidos blandos por *Staphylococcus aureus*", "SSTI por *Staphylococcus aureus*", "infección cutánea/de la estructura cutánea por *Staphylococcus*" y "SSSI por *Staphylococcus aureus*" se usan intercambiamente en la presente y se refieren a una infección de la piel o los tejidos blandos (p. ej. celulitis, abscesos de tejidos blandos, dermonecrosis, miositis u otras infecciones) resultantes de la entrada de *S. aureus* en el cuerpo en una zona en la que un corte, un arañazo, una mordedura u otra herida ha roto la piel. En algunos casos, la SSSI por *S. aureus* es el resultado de que *S. aureus* viva en el cuerpo, y se puede producir espontáneamente en ausencia de una zona visible de lesión cutánea o herida. Estas infecciones pueden afectar a las capas de la piel o tejidos más profundos, tales como el músculo y el tejido conectivo (la red entrelazada de tejido que forma ligamentos, tendones y otras estructuras de soporte del cuerpo). Los abscesos cutáneos también se pueden producir en zonas de la piel en las que el cuerpo ha estado combatiendo contra una infección por *S. aureus*. Las cepas más importantes de *S. aureus* responsables de infecciones de la piel o los tejidos blandos son el *Staphylococcus* resistente a antibióticos conocidos como *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA); cepas resistentes a vancomicina y resistentes a daptomicina de *S. aureus* también provocan SSSI. MRSA es resistente a antibióticos comunes. La SSSI por *Staphylococcus aureus* también puede estar provocada por *Staphylococcus aureus* sensible a metilina (MSSA).

Los mamíferos que tienen riesgo de desarrollar una infección de piel o tejidos blandos por *S. aureus* se pueden tratar de un modo profiláctico. Alternativamente, los mamíferos se pueden tratar cuando presentan síntomas de una infección de la piel o los tejidos blandos por *S. aureus*. La vacunación según se describe en la presente reducirá la gravedad, retardará o prevendrá el desarrollo de síntomas. Los mamíferos tienen un riesgo elevado de infección si están hospitalizados o viven en un establecimiento sanitario, están tratados con antibióticos o están inmunosuprimidos, incluyendo niños que tienen VIH/SIDA u otras enfermedades que comprometan la función inmunitaria, individuos que tienen contacto frecuente con el sistema sanitario, que tienen una enfermedad crónica tal como diabetes, cáncer, HIV/SIDA, que son muy jóvenes o muy viejos, usan frecuentemente antibióticos, que tienen una herida abierta, dermatitis o lesiones cutáneas, nutrición pobre o higiene pobre. Otros mamíferos de riesgo incluyen los que viven en condiciones de vida hacinadas, personal militar, especialmente tropas desplegadas, atletas e internos en prisiones. Otros más con riesgo de desarrollar una infección de la piel o los tejidos blandos por *S. aureus* son los individuos que han tenido previamente estas infecciones o individuos programados para o que hayan tenido una operación o un procedimiento médico invasivo.

Por "Als3p" se entiende un polipéptido que es sustancialmente idéntico a la secuencia de aminoácidos de una secuencia mostrada en la Figura 1A, p. ej., SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o a una proteína ALS3 de *Candida* identificada en GenBank: XP_710431.1, XP_710435.1, AAO72959.1, XP_712646.1, XP_712666.1, EAK91173.1, EAK91169.1, AAO72958.1, EAK93494.1, EAK93472.1, O74623.1, AAD02580.1, EAK90704.1, XP_709985.1. Deseablemente, una Als3p tiene al menos 70, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o incluso 100% de identidad con una secuencia mostrada en la Figura 1A, p. ej., SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

Por "fragmento de Als3p" o "fragmento de una Als3p" se entiende una porción de un polipéptido de Als3p que contiene menos de 1050, 1025, 1000, 975, 950 o 945 aminoácidos. En algunas realizaciones, los fragmentos de Als3p tienen entre 300 y 350 o de 250 a 500 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el fragmento es menor de 1050, 1025, 1000, 975, 950, o 945, 940, 937, 936, 935, 934, 933, 932, 931, o 930, 920, 910, 900, 890, 880, 870, 860, 850, 840, 830, 820, 810, 800, 790, 780, 770, 760, 750, 740, 730, 720, 710, 700, 690, 680, 670, 660, 650, 640, 630, 620, 610, 600, 590, 580, 570, 560, 550, 540, 530, 520, 510, 500, 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 400, 390, 380, 370, 360, 350, 340, 330, 320, 310, 300, 290, 280, 270, 260, 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 o 10 aminoácidos, y, en algunos casos, es inmunogénico.

Un fragmento de Als3p ejemplar es SEQ ID NO: 2, según se muestra en la Figura 1A, o sus fragmentos. En algunos casos, los fragmentos de Als3p tienen entre 14 y 20 aminoácidos de longitud. En general, el fragmento puede ser menor de, p. ej., 325, 320, 310, 300, 290, 280, 270, 260, 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140,

130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 u 11 aminoácidos, y, deseablemente, es inmunogénico. En algunos casos, un fragmento de Als3p está entre 14 y 20 aminoácidos.

Además, los fragmentos de Als3p, por ejemplo, pueden contener una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en una secuencia mostrada en la Figura 1A, p. ej., SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Fragmentos de Als3p deseables adicionales contienen una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en una secuencia mostrada en la Figura 1A, p. ej., SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y/o al menos un aminoácido de flanqueo (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de flanqueo) en el extremo N y/o C de una secuencia mostrada en la Figura 1A, p. ej., SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Otros fragmentos de Als3p preferidos contienen siete o más aminoácidos continuos de una secuencia mostrada en la Figura 1A, p. ej., SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

Ejemplos no limitativos de un fragmento de Als3p incluyen los aminoácidos 1-40, 10-50, 20-60, 30-70, 40-80, 50-90, 60-100, 70-110, 80-120, 90-130, 100-140, 110-150, 120-160, 130-170, 140-180, 150-190, 160-200, 170-210, 180-220, 190-230, 200-240, 210-250, 220-260, 230-270, 240-280, 250-290 y 260-300, 270-310, 280-320 y 290-331 aminoácidos de una secuencia mostrada en la Figura 1A, p. ej., SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y estos fragmentos que tienen una o más de las siguientes características: una o más sustituciones de aminoácidos conservativas (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 sustituciones de aminoácidos conservativas) en una secuencia mostrada en la Figura 1A, p. ej., SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; uno o más aminoácidos (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos) truncados a partir del extremo N y/o C de una secuencia mostrada en la Figura 1A, p. ej., SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y al menos un aminoácido de flanqueo (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de franqueo) en el extremo N y/o C de una secuencia mostrada en la Figura 1A, p. ej., SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

Por "sustancialmente idéntica" se entiende una secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico que exhibe al menos 50% de identidad con una secuencia de referencia. Esta secuencia es generalmente al menos, p. ej., 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a nivel de aminoácidos o nivel de ácido nucleico a una secuencia de referencia. En general, para los polipéptidos, la longitud de secuencias de comparación puede ser al menos cinco aminoácidos, p. ej., 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300 o más aminoácidos, hasta toda la longitud del polipéptido. Para los ácidos nucleicos, la longitud de las secuencias de comparación puede ser generalmente al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o más nucleótidos, hasta toda la longitud de la molécula de ácido nucleico. Se entiende que para los propósitos de determinar la identidad de secuencia cuando se compara una secuencia de ADN con una secuencia de ARN, un nucleótido de timina es equivalente a un nucleótido de uracilo.

También se contemplan secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de los polipéptidos de Als3p o fragmentos de los mismos citados en la presente.

Según se usa en la presente, cuando se menciona que una secuencia de polipéptido o ácido nucleico tiene "al menos X% de identidad de secuencia" con una secuencia de referencia, se entiende que al menos X por ciento de los aminoácidos o nucleótidos en el polipéptido o el ácido nucleico son idénticos a los de la secuencia de referencia cuando las secuencias están alineadas óptimamente. Un alineamiento óptimo de secuencias se puede determinar de varios modos que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, el algoritmo de alineamiento de Smith Waterman (Smith y cols., J. Mol. Biol. 147:195-7, 1981) y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul y cols., J. Mol. Biol. 215: 403-10, 1990). Estos y otros algoritmos de alineamiento son accesibles usando software informático disponible públicamente tal como "Best Fit" (Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics, 482-489, 1981) que se incorpora en GeneMatcher Plus™ (Schwarz y Dayhof, Atlas of Protein Sequence and Structure, Dayhoff, M.O., Ed pp 353-358, 1979), BLAST, BLAST-2, BLAST-P, BLAST-N, BLAST-X, WU-BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2, CLUSTAL o Megalign (DNASTAR). Además, los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualesquiera algoritmos necesarios para alcanzar un alineamiento óptimo a lo largo de las secuencias que se comparan.

Por "adyuvante" se entiende una o más sustancias que pueden provocar la estimulación del sistema inmunitario. En este contexto, un adyuvante se usa para mejorar una respuesta inmunitaria a uno o más antígenos o anticuerpos de la vacuna. Un adyuvante se puede administrar a un sujeto antes, en combinación con o después de la administración de la vacuna o el anticuerpo. Ejemplos de compuestos químicos usados como adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, compuestos de aluminio (p. ej., alumbre, Alhydrogel), aceites, polímeros de bloques, complejos inmunoestimulantes, vitaminas y minerales (p. ej., vitamina E, vitamina A, selenio y vitamina B12), Quil A (saponinas), componentes de la pared celular bacteriana y fúngica (p. ej., lipopolisacáridos, lipoproteínas y glicoproteínas), hormonas, citocinas y factores coestimulantes.

Por "portador" en el contexto de un conjugado se entiende un resto o una partícula, p. ej., KLH, CRM197, toxoide del tétanos, toxoide de la difteria, fragmentos de enterotoxina B, complejo proteínico de la membrana externa de *N. meningitidis*, cualquier otra proteína portadora, un fago, una levadura, un virus, un virosoma o una partícula pseudoviral recombinante, que sea adecuado para ser conectado a o exhibir un polipéptido según se describe en la presente.

Por "conjugado" se entiende un compuesto que incluye un polipéptido descrito en la presente conectado a otro resto o partícula, p. ej., KLH, CRM197, toxoide del tétanos, toxoide de la difteria, fragmentos de enterotoxina B, complejo proteínico de la membrana externa de *N. meningitides*, cualquier otra proteína portadora, un fago, una levadura, un virus, un virosoma o una partícula pseudoviral recombinante.

5 Por "inmunogénica" se entiende cualquier sustancia que sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto.

10 Por "cantidad inmunogénica" en el contexto de una vacuna se entiende una cantidad de la vacuna requerida para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto de un modo clínicamente pertinente. Una cantidad inmunogénica de vacuna usada para poner en práctica los métodos de vacunación que se describen en la presente varía dependiendo del modo de administración, la edad, el peso corporal y la salud general del sujeto. Finalmente, los recetadores decidirán la cantidad y el régimen de dosificación apropiados.

15 Por "aislado" o "purificado" se entiende separado de otros componentes naturalmente adjuntos. Típicamente, un compuesto (p. ej., ácido nucleico, polipéptido, anticuerpo o molécula pequeña) se aísla sustancialmente cuando está al menos 60%, en peso, libre de proteínas y/o moléculas orgánicas presentes en la naturaleza con las que está asociado naturalmente. La definición también se extiende, p. ej., a una molécula de polipéptido o ácido nucleico separada de sus secuencias de flaqueo (p. ej., para una secuencia de aminoácidos, aislada se refiere a una secuencia que está libre de aminoácidos de flaqueo con los que la secuencia está asociada naturalmente en un polipéptido). En algunos casos, el compuesto está al menos 75%, más preferiblemente al menos 90%, y lo más preferiblemente al menos 99%, en peso, aislado. Un compuesto, p. ej., polipéptido, aislado se puede obtener mediante técnicas estándar, por ejemplo, mediante la extracción de una fuente natural (p. ej., purificación de una célula infectada con *Candida*); mediante la extracción de un ácido nucleico recombinante que codifica una Als3p, un fragmento o una variante de Als3p o una de sus proteínas de fusión en cualquier sistema de expresión estándar incluyendo, pero no limitado a, *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*; o al sintetizar químicamente el polipéptido. La pureza se puede medir mediante cualquier método apropiado, p. ej., mediante cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida o análisis por HPLC.

30 Por "conectado a" o "conjugado a" en el contexto de un conjugado se entiende una interacción covalente o no covalente entre el polipéptido y el portador o el socio de fusión. Interacciones no covalentes incluyen, pero no se limitan a, unión por enlace de hidrógeno, interacciones iónicas entre grupos cargados, unión electrostática, interacciones de van der Waals, interacciones hidrófobas entre grupos no polares, interacciones lipóforas y atracciones basadas en LogP.

35 Los términos "péptido," "polipéptido" y "proteína" se usan intercambiamente y se refieren a cualquier cadena de dos o más aminoácidos naturales o no naturales, independientemente de la modificación postraduccional (p. ej., glicosilación o fosforilación), que constituyen la totalidad o parte de un polipéptido o péptido presente en la naturaleza o no presente en la naturaleza, según se describe en la presente.

40 Los términos "portador farmacéuticamente aceptable" y "excipiente farmacéuticamente aceptable" se usan intercambiamente y significan un portador o excipiente que sea fisiológicamente aceptable para el mamífero tratado mientras que retenga las propiedades terapéuticas del compuesto con el que se administra. Una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable ejemplar es la solución salina fisiológica. Otros portadores fisiológicamente aceptables y sus formulaciones son conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, (21^a edición), ed. A. Gennaro, 2005, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA.

50 Por "composición farmacéutica" se entiende una composición que contiene un polipéptido, un conjugado, una vacuna o un anticuerpo descritos en la presente, formulado con un excipiente farmacéuticamente aceptable, y fabricado o vendido con la aprobación de una agencia reguladora gubernamental como parte de un régimen terapéutico para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o un episodio en un mamífero. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular, por ejemplo, para administración intravenosa (p. ej., como una solución estéril libre de émbolos en partículas y en un sistema disolvente adecuado para el uso intravenoso), para administración oral (p. ej., un comprimido, una cápsula, un comprimido oblongo, una cápsula de gelatina o un jarabe), o cualquier otra formulación descrita en la presente, p. ej., en forma de dosificación unitaria.

60 Por "tratar" o "tratamiento" se entiende la gestión médica de un mamífero, p. ej., un ser humano o un mamífero no humano, con la intención de curar, mejorar, estabilizar, reducir la probabilidad de o prevenir una enfermedad, una afección patológica, un trastorno o un episodio, al administrar una composición farmacéutica. Este término incluye tratamiento activo, esto es, tratamiento dirigido específicamente hacia la mejora o asociado con la curación de una enfermedad, una afección patológica, un trastorno o un episodio, y también incluye tratamiento causal, esto es, tratamiento dirigido a la eliminación de la causa de la enfermedad, la afección patológica, el trastorno o el episodio asociados. Además, este término incluye tratamiento paliativo, esto es, tratamiento diseñado para el alivio de los síntomas más que a la curación de la enfermedad, la afección patológica, el trastorno o el episodio; tratamiento sintomático, esto es, tratamiento dirigido a los síntomas inespecíficos de la enfermedad, la afección patológica, el

- 5 trastorno o el episodio asociados; tratamiento preventivo, esto es, tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcialmente o completamente el desarrollo de la enfermedad, la afección patológica, el trastorno o el episodio asociados, p. ej., en un mamífero que todavía no está enfermo, pero que es sensible a, o de otro modo está en riesgo de, una enfermedad, una condición patológica, un trastorno o un episodio particulares; y tratamiento complementario, esto es, tratamiento empleado para complementar otra terapia específica dirigida a la mejora de la enfermedad, la afección patológica, el trastorno o el episodio asociados.
- 10 Por "vacuna", según se usa en la presente, se entiende una composición que provoca una respuesta inmunitaria en un sujeto al que se administra. El modo de administración, la dosis y el número de administraciones pueden ser optimizados de modo conocido por los expertos en la técnica.
- 15 Por "vacunar" o "vacunación", según se usa en la presente, se entiende tratar a un mamífero al administrar una vacuna, p. ej., para prevenir o mejorar una enfermedad, una afección patológica, un trastorno o un episodio.
- 15 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente Descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones.
- Las figuras muestran:
- La Fig. 1A es un listado de dos secuencias de aminoácidos de Als3p, SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
- 20 La Fig. 1B es un listado de una secuencia de ácido nucleico de Als3, SEQ ID NO: 3.
- La Fig. 2 es un conjunto de fotografías que muestran cinéticas de eficacia comparativas de NDV-3 valoradas mediante obtención de imágenes *in vivo*. Las fotografías muestran ratones en cada uno de los grupos de dosificación los días 2, 4 y 7 después de la infección.
- 25 La Fig. 3 es un diagrama que muestra que NDV-3 restringe el volumen de abscesos de MRSA en SSSI murina. El diagrama muestra volumen medio (cm³)/abscesos para el grupo de control y los grupos de dosificación de 3 µg, 10 µg, 30 µg y 100 µg de NDV-3.
- La Fig. 4 es un par de fotografías que muestran que NDV-3 restringe el volumen de abscesos de MRSA en SSSI murina. Izquierda, ratón en el grupo de control; derecha, ratón en el grupo de dosificación de 100 µg de NDV-3.
- 30 La Fig. 5 es un diagrama que muestra que NDV-3 suprime la proliferación de MRSA en SSSI murina. El diagrama muestra el flujo medio/absceso para el grupo de control y los grupos de dosificación de 3 µg, 10 µg, 30 µg y 100 µg de NDV-3.
- La Fig. 6 es un conjunto de imágenes que muestran que NDV-3 limita la proliferación de MRSA y capta neutrófilos. Los datos mostrados son del grupo de dosificación de 100 µg de NDV-3 a los 7 días después de la infección.
- 35 La Fig. 7 es un conjunto de imágenes que muestran que NDV-3 capta células T CD3+ e induce la expresión de IL-17. Los datos mostrados son del grupo de dosificación de 100 µg de NDV-3 a los 7 días después de la infección.
- La Fig. 8 es un conjunto de imágenes que muestran que NDV-3 estimula la expresión de IL-22 y la respuesta de β-defensina. Los datos mostrados son del grupo de dosificación de 100 µg de NDV-3 el día 7 después de la infección.
- La Fig. 9 es un diagrama que muestra la superficie mediana de abscesos costales de ratones de control y vacunados.
- 40 La Fig. 10 es un diagrama que muestra el volumen mediano de abscesos costales de ratones de control y vacunados.
- La Fig. 11 es un diagrama que muestra el volumen mediano de abscesos debido a cepas de MRSA en ratones de control y vacunados el día 7 después de la infección. Los asteriscos indican una reducción significativa en comparación con el control respectivo.
- 45 La Fig. 12 es una imagen de inmunofluorescencia compuesta de un absceso de MRSA de un ratón vacunado con NDV-3 (100 µg).
- La Fig. 13 es una imagen de inmunofluorescencia compuesta de un absceso de MRSA de un ratón de control.

El archivo de la patente o la solicitud contiene dibujos (Figuras 2, 4, 6-8, 12 y 13) realizados a color. Copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujos a color serán proporcionadas por la Oficina previa petición y pago de la tasa necesaria.

5 Según se describe posteriormente, proteína de la secuencia 3 pseudoaglutinínica (Als3p) permite la vacunación contra *S. aureus* en mamíferos identificados por ser de riesgo para el desarrollo de una infección de la piel o los tejidos blandos de *S. aureus*.

10 En los siguientes análisis (en particular, el estudio piloto del Ejemplo 1 y el estudio optimizado del Ejemplo 2) diseñado para evaluar la eficacia de una vacuna de Als3p contra el desarrollo de infección de la piel o los tejidos blandos resultante de *S. aureus* en un modelo en muridos de infección cutánea/de la estructura cutánea (SSSI) por MRSA, se describen en primer lugar los organismos y métodos.

Organismos

Cepas de MRSA

15 MRSA Xen30 (lux+) Roche-16

MRSA LAC-USA300 USA300

MRSA MW2 USA400

20 La cepa Xen30 de *Staphylococcus aureus* se usó en estos estudios in vivo. Se deriva de la cepa parental *S. aureus* MRSA-16 (Roche) y contiene un operón *luxA-E* en un solo sitio de integración cromosómica. Esta cepa de MRSA produce enzima luciferasa y sustrato de aldehído, y emite constitutivamente una señal bioluminiscente cuando es metabólicamente activa. Su virulencia es equivalente a otras cepas de MRSA en el modelo de SSSI en muridos usado según se verifica en estudios piloto, y todas las cepas probadas tienen fenotipos y características de crecimiento similares. Células en fase logarítmica (BHI; 37°C) se cultivaron a partir de bancos celulares maestros validados cuantitativamente y con respecto a la virulencia, se recogieron y se suspendieron en PBS, se sometieron a ultrasonidos y se cuantificaron mediante espectrofotometría hasta las CFU deseadas.

Métodos

30 La eficacia de la vacuna de NDV-3 se evaluaron en un modelo de SSSI en muridos frente a SA resistente a meticilina (MRSA): Xen30 (lux+); LACUSA300; o MW2 (USA400). NDV-3 es una formulación del extremo N recombinante de la proteína superficial de *Candida* proteína Als3 (Figura 1A; SEQ ID NO:2) y el adyuvante Alhydrogel®, en solución salina tamponada con fosfato, pH 7, p. ej., con una dosis de 0,5 ml que contiene, p. ej., 30-300 µg de proteína Als3, y opcionalmente también contiene hidróxido de aluminio en 1,0 mg de Al/ml. Se comparó la eficacia entre regímenes de NDV-3 administrados con adyuvante Alhydrogel (IM) el día 0 y se administró una dosis de recuerdo el día 21. Los controles recibían adyuvante solo. La infección mediante inoculación subcutánea de los dos costados (2×10^7 CFU) se producía 14 días después de la dosis de recuerdo. La superficie, el volumen y las CFU del absceso se cuantificaron durante múltiples días después de la estimulación. La obtención de imágenes *in vivo* (IVIS) del flujo del absceso se realizó en ratones infectados mediante Xen30. Se cuantificaron las respuestas de IgG (ELISA), IFN-γ e IL-17A séricos (ELISpot) en regímenes de vacunación paralelos. Las señales de IL-17A, IL-22, mβD-3, células CD3+ y neutrófilos celulares se valoraron el día 7 después de la infección mediante inmunohistoquímica.

40 Vacuna. La vacunación con NDV-3 se evaluó a través de un intervalo de dosis usando un régimen idéntico de adyuvante Alhydrogel. Se estudiaron en paralelo dosis de 3, 10, 30, 100 o 300 µg (IM). La vacunación primaria (día 0) fue seguida por una dosis de recuerdo idéntica el día de estudio 21. Los ratones fueron infectados 14 días después de la dosis de recuerdo (día de estudio 35).

45 Modelo de SSSI en muridos. Todos los estudios en animales se realizaron según las políticas de uso en animales aprobadas de LABioMed en Harbor-UCLA. Ratones Balb/C (Harlan) se vacunaron como anteriormente. Un modelo de absceso de piel subcutáneo / tejidos blandos se modificó de Ding y cols. (J Bacteriol 2008 190:7123-9) y/o Voyich y cols. (J Infect Dis 2006 194:1761-1770) para estos estudios. El día del estudio 35, los ratones fueron anestesiados, los costados se afeitaron y se esterilizaron y se introdujeron inóculos de 2×10^7 CFU (sin cuentas o matriz) en el compartimento subcutáneo mediante inyección (100 µl). Se usó en cada estudio un mínimo de 20 ratones por grupos de control o régimen de vacunación.

55 Cuantificación de los Abscesos. La superficie/el volumen de los abscesos se midieron en cada costado del ratón durante el período de estudio hasta 14 días después de la estimulación. Para hacer esto, los ratones fueron

anestesiados y la longitud (l) y la anchura (w) de la zona lesionada se valoraron para cuantificar la superficie de absceso o dermonecrosis (cm^2). El volumen (cm^3) del absceso se calculó según la fórmula para un elipsoide esférico: $[v = (\pi/6) \times l \times w^2]$.

5 Estudios de obtención de imágenes. La cepa de MRSA Xen30 tiene un operón *lux* autocontenido en su cromosoma. La construcción codifica el sustrato de aldehído y la propia enzima luciferasa; así, no se requiere un sustrato de luciferina exógeno (Kadurugamuwa y cols., Infect Immun 2003 71:882-890). Los días de estudio seleccionados, los ratones de control y vacunados se sometían a obtención de imágenes *in vivo* (IVIS) usando un sistema IVIS (Caliper Life Sciences, Inc.). Se capturaron señales de luminiscencia a lo largo de un período de cinco minutos y se
10 analizaron usando el software Living Image como fotones / min / absceso.

Cultivo Cuantitativo. En momentos preseleccionados después de la infección, los ratones se sacrificaron humanitariamente y se procesaron para el cultivo cuantitativo de abscesos. Cada costado se disecó asépticamente, el absceso se extirpó y se preparó para el cultivo. Los abscesos se homogeneizaron individualmente y se diluyeron
15 en serie en PBS estéril para el cultivo cuantitativo sobre placas de agar de sangre de oveja. Los cultivos se incubaron (37°C) durante 24 horas y las colonias resultantes se enumeraron.

Mecanismos Inmunológicos. Se usaron enfoques múltiples y complementarios para valorar correlaciones potenciales de la eficacia de la vacuna de NDV-3 en el modelo en murinos de SSSI debida a MRSA. Estos estudios se
20 enfocaron a la cepa Xen30, permitiendo la correlación con datos de IVIS en el criterio de valoración de 7 d.

A. Cuantificación de anticuerpos. Se determinaron niveles de anticuerpos de IgG en un formato de ELISA de 96 pocillos a lo largo de un intervalo de diluciones. Los valores representan la dilución corregida media geométrica de ensayos por triplicado que comparan sueros inmunizados frente a de control.

25 B. Cuantificación de Citocinas. Se determinaron respuestas de IFN- γ e IL-17A en células T mediante análisis ELISpot de esplenocitos aislados de ratones inmunizados frente a de control y se expusieron al inmunógeno NDV-3. El número de unidades formadoras de puntos (SPUs o SFUs, usados intercambiamente) se cuantificó por 10^6 células que producen bien IFN- γ o bien IL-17A. La viabilidad celular se verificó mediante la producción de IFN- γ después de la estimulación con 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA) e ionomicina según protocolos establecidos.

30 C. Inmunohistoquímica. Se valoraron determinantes inmunológicos asociados con la eficacia de la vacuna en tejidos obtenidos de animales vacunados y de control después de 7 d de infección mediante métodos estándar. Para estudios inmunohistoquímicos, en resumen, secciones embebidas en parafina verticales de 3 μm se desparafinaron y se rehidrataron seguido por solución de recuperación de antígenos termoinducida (Dako, Carpintería, CA). Las secciones se incubaron con tampón de bloqueo endógeno doble (Dako) durante 15 min a temperatura ambiente para bloquear actividad de peroxidasa endógena, y la unión a anticuerpo inespecífica se bloqueó mediante
35 incubación con suero normal al 5% correspondiente al anticuerpo primario. A continuación, las secciones se incubaron durante la noche a 4°C con un anticuerpo primario que elige como diana un antígeno específico de interés (Tabla 1). A continuación, las secciones se lavaron y se incubaron durante 30 min con un anticuerpo secundario apropiado (Tabla 1), bien conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) o bien biotinilado (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA). A continuación, se alcanzó el desarrollo inmunohistoquímico mediante 30 min de desarrollo con estreptavidina-HRP (Dako) y 3,3'-diaminobencidina (DAB; Vector Laboratories, Burlingame, CA), y se tiñó por contraste con hematoxilina. Las imágenes se visualizaron usando un microscopio Olympus BX43 empleando una cámara digital DP21 para la captura de imágenes.

45 D. Inmunofluorescencia. Para evaluar el impacto de la vacunación con NDV-3 sobre las interrelaciones de determinantes inmunológicos y *S. aureus* en el contexto de una infección *in vivo*, se realizaron estudios de inmunofluorescencia que empleaban microscopía confocal usando métodos establecidos. En resumen, se prepararon secciones embebidas en parafina como anteriormente y se incubaron con tampón de inmunofluorescencia (albúmina de suero bovino al 1% y suero de ternero fetal al 2%) durante una hora a temperatura ambiente. Anticuerpos primarios dirigidos a antígenos diana de interés (Tabla 1) se incubaron con secciones tisulares procedentes de ratones de control o vacunados a 4°C durante la noche. Posteriormente,
50 anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 1) diluidos en tampón de IFF (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se incubaron durante 60 minutos. A continuación, las secciones se lavaron en PBS y se montaron usando Vectashield H-1500 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para minimizar el fotoblanqueamiento. Las imágenes se visualizaron usando un microscopio confocal Leica SP2 empleando láseres de argón (488 nm), criptón (568 nm) y helio-neón (633 nm) y el software confocal versión 2.0 (Leica Instruments, Alemania).

Tabla 1. Anticuerpos usados para estudios inmunohistoquímicos o de inmunofluorescencia.

Anticuerpos primarios

Antígeno diana

Ly-6G (granulocitos)

Ly-6C (monocitos / macrófagos)

β -Defensina-1 de ratón(mBD-1)

β -Defensina-3 de ratón (mBD-3)

Factor plaquetario 4 (PF-4) de ratón

Staphylococcus aureus (ratón)

Staphylococcus aureus (conejo)

Proteína A estafilocócica

CD3- γ

CD3- ϵ

IL-17

IL-22

Anticuerpos secundarios

Burro α -conejo conjugado a Alexa 488

Burro α -rata conjugado a Alexa 488

Goat α -rata conjugado a Alexa 555

Burro α -conejo conjugado a Alexa 568

Burro α -cabra conjugado a Alexa 633

Burro α -conejo conjugado a Alexa 647

Estreptavidina conjugada a Alexa 633

5 Análisis estadísticos. Las diferencias en los resultados experimentales se compararon basándose en estimaciones de potencia que indican que 16-20 ratones por grupo da > 85% de potencia para detectar diferencia de 1 log en CFU por gramo de tejido o una superficie de absceso de 2 mm ($\alpha = 0,05$; prueba de la U de Mann-Whitney. Los valores de P se definen en la Tabla 2 y la Tabla 3 (posteriormente).

Ejemplo 1

10 En un estudio piloto, la vacunación con NDV-3 reducía los parámetros de SSSI debida a MRSA, con eficacia equivalente para limitar la superficie, el volumen y las CFU del absceso para las cepas Xen30, USA300 y MW2. La respuesta inmunitaria murina se correlacionaba con la eficacia protectora relacionada con la dosis de NDV-3. Estos resultados se muestran en la Tabla 2 y la Figura 2. Estos resultados indican que la vacuna de NDV-3 inducía respuestas de células B y T robusta que corresponde con la eficacia protectora contra MRSA en el modelo en múridos de SSSI.

15

Tabla 2. Eficacia de NDV-3 en MRSA Xen30 SSSI y Respuesta inmunitaria en Modelos en múridos.

Absceso	Control	3 μ g	10 μ g	30 μ g	100 μ g	300 μ g
Superficie 7 d	1,88cm ²	1,47cm ^{2*}	1,59cm ^{2*}	0,99cm ^{2††}	0,77cm ^{2††}	0,69cm ^{2††}
Volumen 7 d	1,29cm ³	0,95cm ^{3*}	0,96cm ^{3**}	0,46cm ^{3††}	0,34cm ^{3††}	0,29cm ^{3††}
Flujo 7 d	1,92x10 ⁵	1,48x10 ^{5*}	1,81x10 ⁵	1,07x10 ^{5*}	1,65x10 ^{5*}	9,03x10 ^{4††}
Mediana	7,9	7,8	8,1	8,1	7,9	7,5 [†]
Log CFU	(7,6/8,0)	(7,8/7,8)	(7,8/7,8)	(7,9/7,9)	(7,5/8,0)	(7,4/7,8)
IM 7 d	[n=36]	[n=20]	[n=20]	[n=36]	[n=36]	[n=36]
Mediana	1,70	0,05 ^{Δ††}	ND	ND	0,05 ^{Δ††}	1,48

Absceso	Control	3 µg	10 µg	30 µg	100 µg	300 µg
Log CFU	(1,0/2,8)	(0,05/1,3)			(0,05/1,7)	(0,05/2,6)
IM 14 d	[n=48]	[n=39]			[n=39]	[n=17]
Mediana	3,54	3,92			2,26**	2,40**
Log CFU	(2,6/6,9)	(3,2/5,5)	ND	ND	(1,8/3,6)	(1,4/3,8)
14d SubQ	[n=20]	[n=20]			[n=20]	[n=20]
Analito						
IgG	1,0 GCU	44,8 GCU ^{††}	ND	97,8 GCU ^{††}	81,8 GCU ^{††}	ND
IFN-γ	9,5 SPU	12,8 SPU	ND	21,9 SPU	34,3 SPU*	ND
IL-17	18,9 SPU	132,6 SPU ^{††}	ND	62,2 SPU	161,2 SPU ^{**}	ND

(cuartiles 25%/75%); * $P < 0,5$; ** $P < 0,1$; [†] $P < 0,05$; ^{††} $P < 0,01$; GCU, media geométrica / unidades corregidas por dilución; SPU, unidades formadoras de puntos medias / 10^6 esplenocitos; ^Δ límite de detección.

Análisis

La vacuna de NDV-3 reducía significativamente la superficie, el volumen del absceso, la señal de luminiscencia y las densidades de CFU en este modelo en múridos de SSSI MRSA. La eficacia de NDV-3 era equivalente para cada una de las cepas de MRSA evaluadas en este estudio. Los datos inmunológicos procedentes de ratones vacunados idénticamente a los estimulados con infección indican que la vacuna de NDV-3 induce respuesta de células B y T robustas que parecen reflejar una relación dosis-respuesta. Los datos inmunológicos procedentes de ratones vacunados idénticamente a los estimulados con infección indican que la vacuna de NDV-3 induce respuesta de células B y T robustas que reflejan una relación dosis-respuesta. Colectivamente, estos resultados proporcionan evidencia de que NDV-3 induce una respuesta de Th1 / Th17 mixta que parece estar asociada predominantemente con la eficacia protectora. La respuesta de anticuerpo puede contribuir a mecanismos protectores de NDV-3. Estos resultados indican que la vacuna de NDV-3 es útil como un medio para prevenir o mitigar infección cutánea o abscesos por MRSA o ambos en mamíferos.

Ejemplo 2

Se realizó un análisis optimizado adicional, y los resultados se resumen en la Tabla 3 y las Figuras 3-8. Como el Ejemplo 1, este estudio evaluaba la eficacia y los mecanismos inmunológicos de la vacuna de NDV-3 en un modelo en múridos de infección de piel / estructura cutánea debida a SA resistente a meticilina (MRSA). El tamaño del absceso, la densidad de MRSA y las CFU se compararon a lo largo del tiempo en grupos inmunizados con NDV-3 y de control. Las concentraciones séricas de IgG, IFN γ , IL-17A, la inducción de IL-17A, IL-22 y m β D-3 tisulares y la infiltración de células T CD3⁺ o neutrófilos cuando estaban mediados por NDV-3 se determinaron en paralelo. La inmunización con NDV-3 alcanzaba eficacia protectora contra MRSA en cuanto a la superficie, el volumen, la densidad bacteriana y las CFU del absceso en comparación con adyuvante solo. La eficacia protectora de NDV-3 correspondía a incrementos en la IgG sérica, biomarcadores séricos y tisulares de la polarización de Th1-Th17, y las correspondientes infiltración de neutrófilos e inducción de péptidos de defensa del hospedador en el contexto de los abscesos. Estos datos demostraban además que la inmunización con NDV-3 induce mecanismos de células B y T robustos de eficacia protectora contra MRSA en el contexto de la piel y la mucosa.

Resultados

NDV-3 era eficaz contra MRSA según se medía por la superficie, el volumen y las CFU de los abscesos frente al adyuvante solo (Tabla 3). La eficacia según se medía por la superficie de dermonecrosis y el volumen del absceso eran equivalentes para todas las cepas probadas. Incrementos significativos en la IgG sérica, los biomarcadores séricos y tisulares de la polarización de Th1 (INF- γ) y Th17 (IL-17) (Tabla 3), la infiltración de neutrófilos (Ly6G), la elaboración de IL-22, así como la inducción de m β D-3 se correlacionaban con la eficacia protectora de NDV-3 (Figuras 3-8).

35

Tabla 3. Eficacia y respuesta inmunitaria de NDV-3 frente a MRSA Xen30 en SSSI murina.

Absceso	Control	3µg	10µg	100µg
Superficie d7	1,88cm ²	1,47cm ^{2*}	1,59cm ^{2*}	0,77cm ^{2††}
Volumen d7	1,29cm ³	0,95cm ^{3*}	0,96cm ^{3**}	0,38cm ^{3††}
Flujo d7	3,22x10 ⁵	1,48x10 ^{5*}	2,15x10 ^{5*}	1,06x10 ^{5**}
Media Geométrica	7,50	6,23 [†]	6,68 [†]	6,05 [†]
Log CFU	(8,0/7,4) ^a	(6,4/6,1)	(6,8/6,4)	(6,2/5,6)
IM d 7	[n=54]	[n=20]	[n=20]	[n=20]
Analito				
IgG	1,0 GCU ^b	44,8 GCU ^{††}	ND	81,8 GCU ^{††}
IFN γ	9,5 SFU ^c	12,8 SFU	ND	34,3 SFU [*]
IL-17	18,9 SFU	132,6 SFU ^{††}	ND	161,2 SFU ^{**}

^a Varianza media

5 ^b GCU, media geométrica / unidades corregidas por dilución

^c SPU, unidades formadoras de puntos / 10⁶ esplenocitos

* P < 0,5; ** P < 0,1; † P < 0,05; †† P < 0,01

Conclusión

10 NDV-3 induce eficacia protectora contra MRSA en SSSI murina. Los mecanismos inmunológicos de eficacia incluían respuestas de células B y T robustas coherentes con paradigmas de Th1-Th17 en los que los neutrófilos y los péptidos de defensa del hospedador son elegidos como diana y coordinados en el contexto de una infección.

Ejemplo 3

15 Se efectuó un conjunto adicional de experimentos para evaluar la eficacia de la vacuna de NDV-3 en un modelo en murinos de SSSI debida a MRSA Xen30 y cepas comparativas de MRSA. Se efectuaron experimentos como los descritos en los Ejemplos 1 y 2. La cinética de datos medianos de eficacia de la vacuna frente al tiempo se muestra en la Fig. 9 (superficie del absceso costal mediano de ratones de control y vacunados) y la Fig. 10 (volumen del absceso costal medio de ratones de control y vacunados). Los datos confirman que la vacunación con NDV-3 suprime la evolución del absceso, particularmente en dosificaciones mayores de 3 µg.

20 Además, la eficacia de la vacuna se probó contra tres cepas de MRSA diferentes: Xen 30, USA300 y MW2. Para cada cepa de MRSA, se probaron un control negativo y un grupo de dosificación de 100 µg. Se determinó el volumen medio de la lesión el día 7 después de la infección, según se muestra en la Fig. 11. Cada cepa era el mismo inóculo (2 x 10⁷). MW2 exhibía baja virulencia en estos experimentos.

25 Los datos demuestran que independientemente de la cepa de MRSA probada, la vacuna de NDV-3 tiene una eficacia equivalente (p. ej., aproximadamente 50% de reducción) en la restricción del volumen del absceso. Así, la eficacia de NDV-3 no es específica de la cepa de MRSA.

Ejemplo 4

30 En un conjunto adicional de experimentos, se registraron y analizaron imágenes de inmunofluorescencia compuestas de abscesos de MRSA. La Fig. 12 es una imagen de inmunofluorescencia compuesta de un absceso de MRSA representativo procedente de un ratón vacunado con NDV-3 (100 µg) y la Fig. 13 es una imagen de inmunofluorescencia compuesta de un absceso de MRSA representativo procedente de un ratón de control.

35 En cada una de las imágenes anteriores, cada componente de la imagen es de la misma lesión, amplificada aproximadamente 500 veces. Como la señal de inmunofluorescencia es difícil de resolver a baja potencia, se registraron imágenes para cada sección de la lesión a una potencia superior, moviéndose desde la epidermis de la piel, dentro de la subdermis y hacia la hipodermis. Así, los componentes se unen para ilustrar un mapa de inmunofluorescencia continuo de *S. aureus* (azul), neutrófilos (rojo) y CD3+ (células T) verde, a través de una lesión y manteniendo una amplificación suficiente para la resolución de inmunofluorescencia. Los componentes de la imagen representan una función de campos de alta potencia situados para capturar sistemáticamente superficies

equivalentes en las lesiones de NDV-3 y de control para la comparación cara a cara de inmunofenotipos de abscesos.

5 Como revelan las Figs. 12 y 13, en los abscesos vacunados con NDV-3, hay pocos organismos de MRSA (azul), y están restringidos a la epidermis, con infiltración de neutrófilos (rojo) mediada por un aflujo de células T CD3+ (verde). En contraste, en el absceso de control, hay muchos organismos de MRSA y son invasivos hacia dos regiones distintas (epidermis e hipodermis), correspondiendo a sustancialmente menos infiltración de neutrófilos y células CD3+. Aunque las imágenes mostradas en las Figs. 12 y 13 son de lesiones individuales, son representativas de lesiones en grupos vacunados y de control en general y son coherentes con los hallazgos
10 cuantitativos descritos en los Ejemplos precedentes.

Ejemplo 5

Las composiciones y los métodos descritos en la presente se pueden usar, p. ej., para vacunar a un ser humano con riesgo de desarrollar una infección de la piel o los tejidos blandos por *Staphylococcus aureus* contra *Staphylococcus aureus*. En primer lugar, se identifica un ser humano con riesgo de desarrollar una SSSI por *S. aureus*. En segundo
15 lugar, al ser humano se le administra una cantidad inmunogénica de una vacuna que comprende un polipéptido que comprende Als3p, o uno de sus fragmentos inmunogénicos, en un medio farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, al ser humano se le administran entre una y tres dosis de NDV-3 que contienen entre 3 y 1000 µg del extremo N recombinante de la proteína Als3 superficial de *Candida* (SEQ ID NO:2) por dosis, presentándose múltiples dosis a intervalos de dos semanas a seis meses.

20 Se espera que, después de la administración de la vacuna, el ser humano tenga un riesgo disminuido de desarrollar una SSSI de *S. aureus* durante un período que dura de un mes a varios años o más.

25 Asimismo, un ser humano identificado por tener una SSSI por *S. aureus* se puede tratar mediante la administración de una cantidad inmunogénica de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que comprende Als3p, o uno de sus fragmentos inmunogénicos, en un medio farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, al ser humano se le administran entre una y tres dosis de NDV-3 que contienen entre 3 y 1000 µg del extremo N recombinante de la proteína Als3 superficial de *Candida* (SEQ ID NO:2) por dosis, presentándose múltiples dosis a intervalos de dos semanas a seis meses.

30 Se espera que, después de la administración de la composición farmacéutica, disminuya la gravedad de la SSSI por *S. aureus* del ser humano.

Ejemplo 6

35 Las composiciones y los métodos descritos en la presente se pueden usar, p. ej., para vacunar a una especie bovina con riesgo de desarrollar una infección de la piel o los tejidos blandos por *Staphylococcus aureus* contra *Staphylococcus aureus*. En particular, la especie bovina puede tener riesgo de desarrollar mastitis bovina provocada por *S. aureus*. En primer lugar, se identifica una especie bovina con riesgo de desarrollar una SSSI por *S. aureus*, p. ej., mastitis bovina. Por ejemplo, se puede considerar que cualquier bovino productor de leche tiene riesgo de desarrollar mastitis bovina provocada por *S. aureus*. En segundo lugar, a la especie bovina se le administra una
40 cantidad inmunogénica de una vacuna que comprende un polipéptido que comprende Als3p, o uno de sus fragmentos inmunogénicos, en un medio farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, a la especie bovina se le administran entre una y tres dosis de NDV-3 que contienen entre 3 y 1000 µg del extremo N recombinante de la proteína Als3 superficial de *Candida* (SEQ ID NO:2) por dosis, presentándose múltiples dosis a intervalos de dos semanas a seis meses.

45 Se espera que, después de la administración de la vacuna, la especie bovina tenga menos riesgo de desarrollar una SSSI por *S. aureus*, p. ej., mastitis bovina.

50 Asimismo, una especie bovina identificada por tener una SSSI por *S. aureus*, p. ej. mastitis bovina, se puede tratar mediante la administración de una cantidad inmunogénica de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que comprende Als3p, o uno de sus fragmentos inmunogénicos, en un medio farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, a la especie bovina se le administran entre una y tres dosis de NDV-3 que contienen entre 3 y 1000 µg del extremo N recombinante de la proteína Als3 superficial de *Candida* (SEQ ID NO:2) por dosis, presentándose múltiples dosis a intervalos de dos semanas a seis meses.

55 Se espera que, después de la administración de la composición farmacéutica, disminuya la gravedad de la SSSI por *S. aureus*, p. ej. mastitis bovina, de la especie bovina.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna que comprende de 30 a 300 µg de una proteína Als3 aislada que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato, pH 7, para el uso en un método de tratamiento de un absceso cutáneo que comprende una infección por *Staphylococcus aureus* en un mamífero.
2. La vacuna para el uso según la reivindicación 1, en la que dicha *Staphylococcus aureus* es una cepa MRSA de *Staphylococcus aureus* o una cepa MSSA de *Staphylococcus aureus*.
- 10 3. La vacuna para el uso según la reivindicación 1, en la que dicha *Staphylococcus aureus* es una cepa resistente a vancomicina (VRSA) o resistente a daptomicina (DRSA) de *Staphylococcus aureus*.
4. La vacuna para el uso según la reivindicación 1, en la que dicha proteína Als3 está conjugada a un portador.
- 15 5. La vacuna para el uso según la reivindicación 4, en la que dicho portador comprende hemocianina de lapa californiana (KLH), CRM197, toxoide del tétanos, toxoide de la difteria, fragmentos de enterotoxina B o complejo proteínico de la membrana externa de *N. meningitides*.
- 20 6. La vacuna para el uso según la reivindicación 4, en la que dicho portador es un fago, una levadura, un virus, un virosoma o una partícula pseudoviral recombinante.
7. La vacuna para el uso según la reivindicación 1, en donde dicha vacuna se administra mediante administración intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral o sublingual, o se administra para inhalación en una formulación en micropartículas.
- 25 8. La vacuna para el uso según la reivindicación 1, en donde dicha vacuna comprende un adyuvante inmunoestimulante.
- 30 9. La vacuna para el uso según la reivindicación 1, caracterizada por que la vacuna se formula para el uso con un antibiótico contra *Staphylococcus aureus*.

ES 2 716 800 T3

FIGURA 1A

SEQ ID NO:1

```

1 MLQOYTLLLI YLSVATAKTI TGVFNSFNLS TWSNAATYNY KPGGTPTWNA VLGWSLDGTS
61 ASPGDTFTLN MPCVFKFTTS QTSVDLTAHG VKYATCQFQA GEEFMTFSTL TCTVSNLTLTP
121 SIKALGTVTL PLAFNVGGTG SSVLDLESKC FTAGTNTVTF NDGGKKISIN VDFERSNVDP
181 KGYLTDNRVI PSLNKVSTLF VAPQCANGYT SGTMGFANTY GDVQIDCSNI HVGITKGLND
241 WNYPVSSSEF SYTKTCSSNG IFITYKNVPA GYRPFVDAYI SATDVNSYTL SYANEYTCAG
301 GYWQRAPFTL RWTGYRNSDA GSNQIVIVAT TRTVDSTTA VTTLPFDPNR DKTKTIEILK
361 PIPTTTITTS YVGVTTSYST KTAPIGETAT VIVDIPYHTT TTVTSKWTGT ITSTTHTNP
421 TDSIDTVIVQ VPSPNPTVTT TEYWSQSFAT TTTITGPPGN TDTVLIREPP NHTVTTTEYW
481 SESYTTTSTF TAPPGGTDVSV LIKEPPNPTV TTTEYWSQSF TTTSTFTAPP GGTDVSVIIE
541 PFNHTVTTTE YWSQSYTTTT TVTAPPGGTD TVLVREPPNH TVTTTEYWSQ SYTTTTTIVIA
601 PPGGTDVSVI REPPNPTVTT TEYWSQSYAT TTTITAPPGE TDTVLIREPP NHTVTTTEYW
661 SQSYATTTTI TAPPGGTDVSV LIKEPPNPTV TTTEYWSQSF ATTTTFTAPP GGTDVSVIIE
721 PFNHTVTTTE YWSQSYATTT TITAPPGETD TVLVREPPNH TVTTTEYWSQ SYATTTTIIA
781 PPGGTDVSVI REPPNPTVTT TEYWSQSYAT TTTITAPPGE TDTVLIYDTM SSSEISSFSR
841 PHYTNHTTLW STTWVLETKT ITETSCEGDK GCSWVSVSTR IVTIPNNIET PMVTNTVDST
901 TTESTSQSPS GIFSESGVSV ETESSTVTTA QTNPSVPTTE SEVVFTTKGN NENGPYESPS
961 TNVKSSMDEN SEFTTSTAAS TSTDENETI ATTSVEASS PISSSADET TTVTTAEST
1021 SVIEQPTNNN GGGKAPSATS SPSTTTTANN DSVITGTTST NQSQSQSQYN SDTQQTLLSQ
1081 QMTSSLVSLH MLTTFDGS GS VIQHTWL CG LITLLSLFI

```

SEQ ID NO:2

```

1 KTITGVNSF NSLTWSNAAT YNYKPGTPT WNAVLGWSLD GTSASPGDTF TLNMPVCFKF
61 TTSQTSVDLT AHGVKYATCQ FQAGEEFMTF STLTCTVSNT LTPSIKALGT VTLPLAFNVG
121 GTGSSVDLED SKCFTAGTNT VTFNDGGKKI SINVDERSN VDPKGYLTD RVIPLNPKVS
181 TLFVAPQCAN GYTSGMTGFA NTYGDVQIDC SNIHVGITKG LNDWNPVSS ESFSYTKTCS
241 SNGIFITYKN VPAGYRPFVD AYISATDVNS YTLSYANEYT CAGGYWRAP FTLRWTGYRN
301 SDAGSNGIVI VATTRTVTDS TTAVTTLPF DPNRDKTIE ILKPIPTTI TTSYVGVTTT
361 YLTKTAPIGE TATVIVDIPY HTTTTTSKW TGTITSTTH TNPTDSIDTV IVQVPL

```

ES 2 716 800 T3

FIGURA 1B

SEQ ID NO:3

```
1      AAGACAATCACTGGTGTTTTCAACAGTTTT AATTCATTGACTTGGTCTAATGCTGCTACG
61     TATAATTATAAGGGACCAGGAACCCCAACT TGGAAATGCTGTTTTGGGTTGGTCTTTAGAT
121    GGTACTAGTGCAAGTCCGGGAGATACATTC ACATTGAATATGCCATGTGTGTTTAAATTT
181    ACTACTTCTCAAACATCTGTTGATTTGACT GCTCATGGTGTAAATATGCTACATGTCAA
241    TTTCAGGCAGGTGAAGAATTTATGACCTTT TCTACATTAACATGTAATGTGAGCAATACT
301    TTGACTCCATCTATTAAGGCTTTGGGTACT GTCACTTTACCACCTGCATTCAATGTAGGT
361    GGAAGTGGTTCTTCTGTTGATTTGGAAGAT TCTAAATGTTTTACTGCTGGTACTAACACA
421    GTTACATTTAATGATGGTGGCAAGAAAATC TCAATTAATGTTGATTTTGAAAGGTCAAAT
481    GTCGATCCAAAAGGGTACTTAACTGATTCC AGAGTTATACCAAGTCTCAACAAAGTGTCA
541    ACTCTTTTTGTTGCACCACAATGTGCAAAT GGTACACATCTGGTACAATGGGATTCGCT
601    AACACTTATGGTGATGTTCAAATGACTGT TCAAATATTCATGTTGGTATTACAAAAGGA
661    TTGAATGATTGGAATTATCCGGTTTCATCT GAATCATTTAGTTACACCAAACTTGTTC
721    TCTAATGGTATCTTTATCACATATAAAAAC GTTCCTGCCGGTTATCGTCCATTTGTTGAC
781    GCTTATATTTCTGCTACAGATGTTAATTCTG TACACCTTGTGCTATGCTAATGAATATACT
841    TGTGCTGGTGGTTATTTGGCAACGTGCACCT TTCACATTAAGATGGACTGGATACAGAAAT
901    AGTGATGCTGGATCTAACGGTATTTGTTATT GTGGCTACTACCAGAACAGTTACAGACAGT
961    ACTACCGCCGTGACCACCTTACCATTCGAT CCTAACCGCGACAAACTAAGACAATTGAA
1021  ATTTTGAAACCTATTTCCAACAAC TACAATC ACAACATCATATGTTGGTGTGACTACTTCC
1081  TACCTGACCAAACTGCACCAATTGGGGGAA ACTGCTACTGTTATGTTGATATTCCATAT
1141  CACACTACCCTACTGTTACCAGTAAATGG ACAGGAACAATTACTTCCACCACAACACAT
1201  ACTAATCCAAC TACTCAATAGACTGTC AATTGTACAAGTTCCTACTGTGA
```

*

*codón de detención

FIGURA 2

Cineética de Eficacia Comparativa de NDV-3 Valorada mediante Obtención de Imágenes *in Vivo*

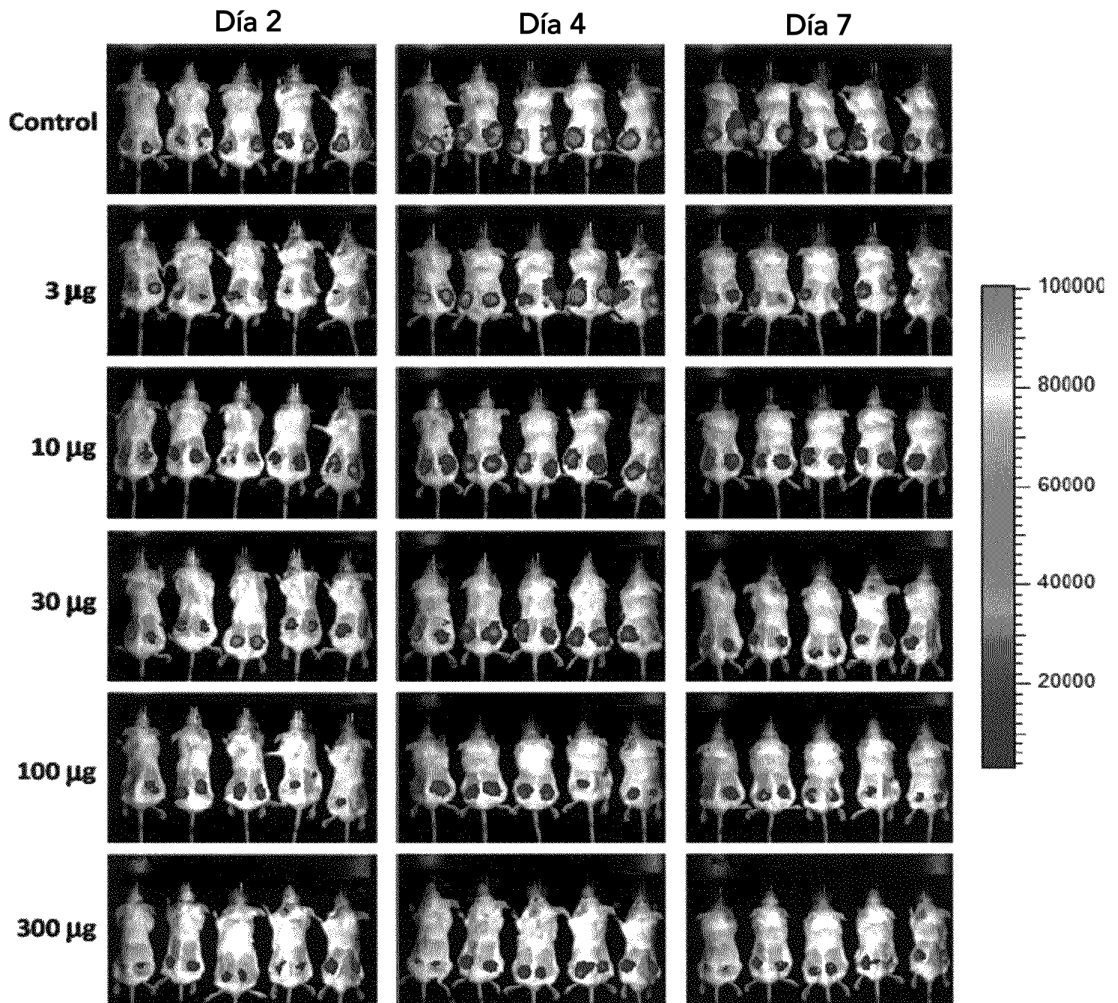


FIGURA 3

NDV-3 Restringe el Volumen de Abscesos por MRSA en SSSI en Múridos

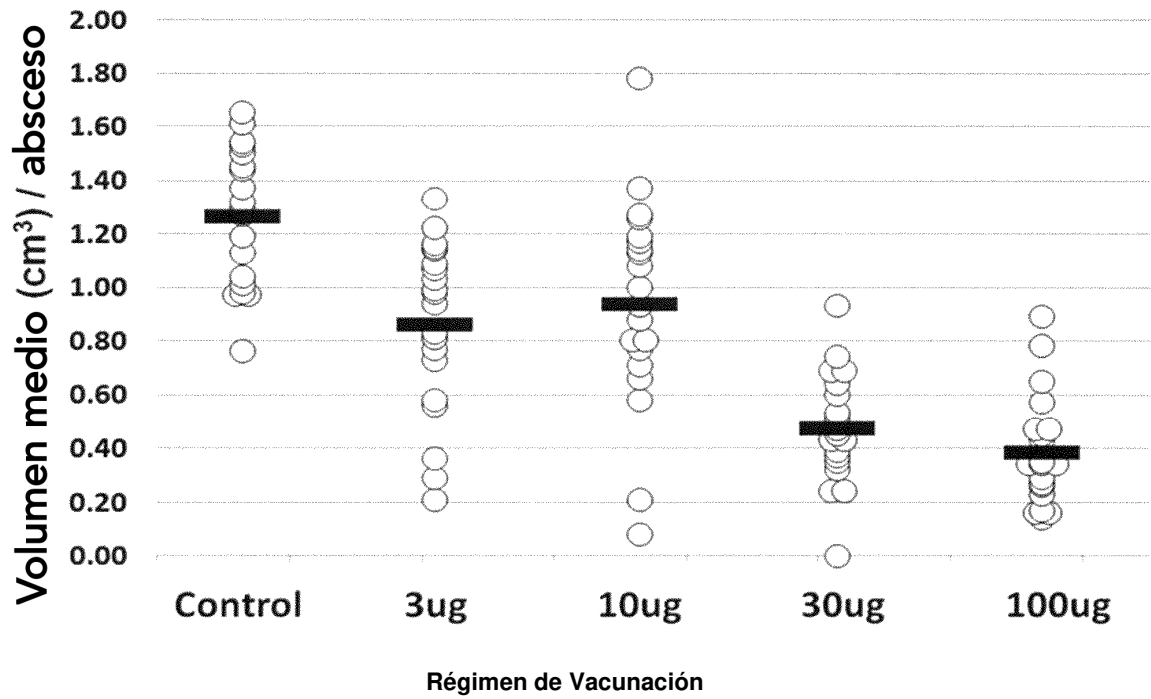
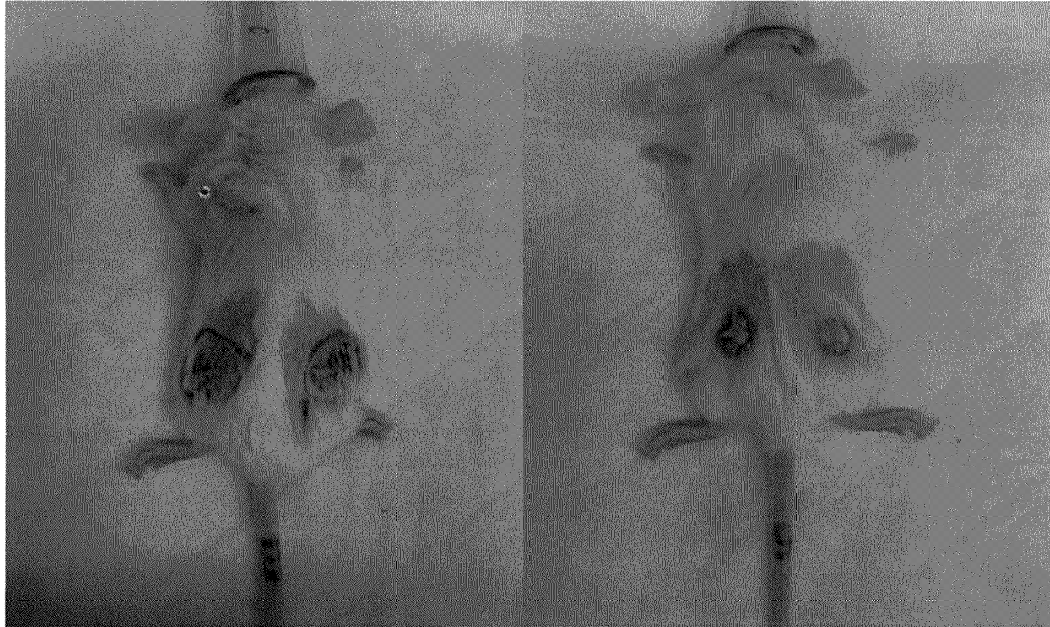


FIGURA 4

NDV-3 Restringe el Volumen de Abscesos de MRSA en SSSI en Múridos



Control

100 µg

Volumen de Abscesos Medio (cm³)

FIGURA 5

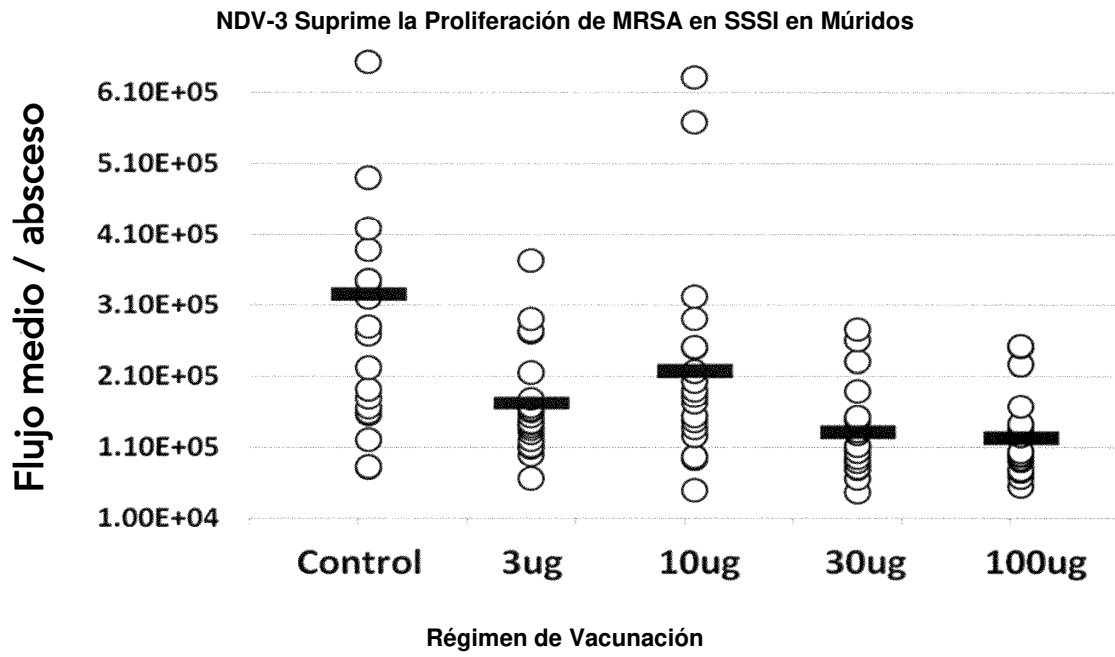
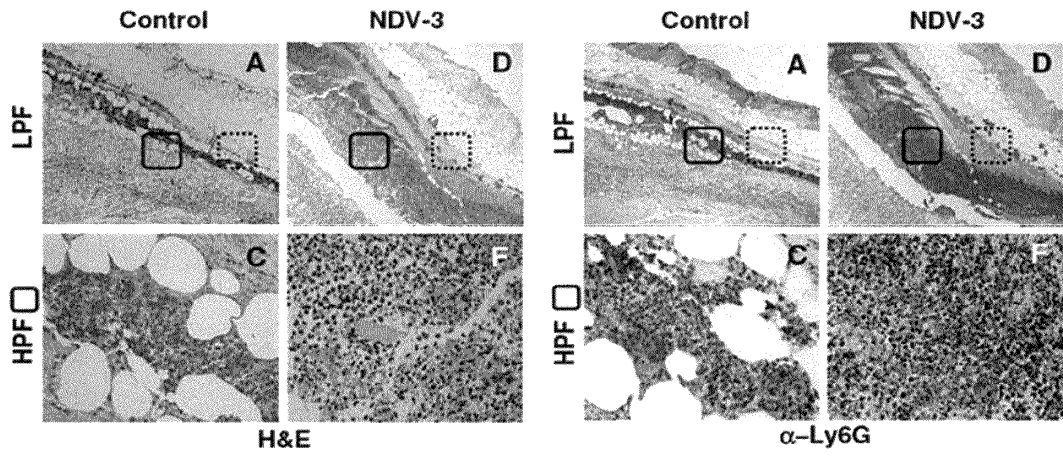


FIGURA 6

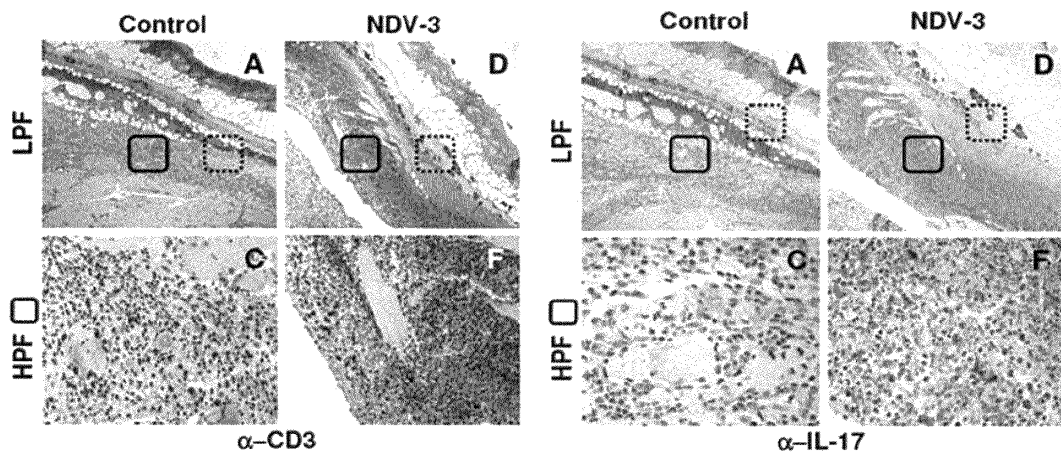
NDV-3 Limita la Proliferación de MRSA y Capta Neutrófilos



Datos procedentes de una dosis de 100 µg 7 d después de la infección

FIGURA 7

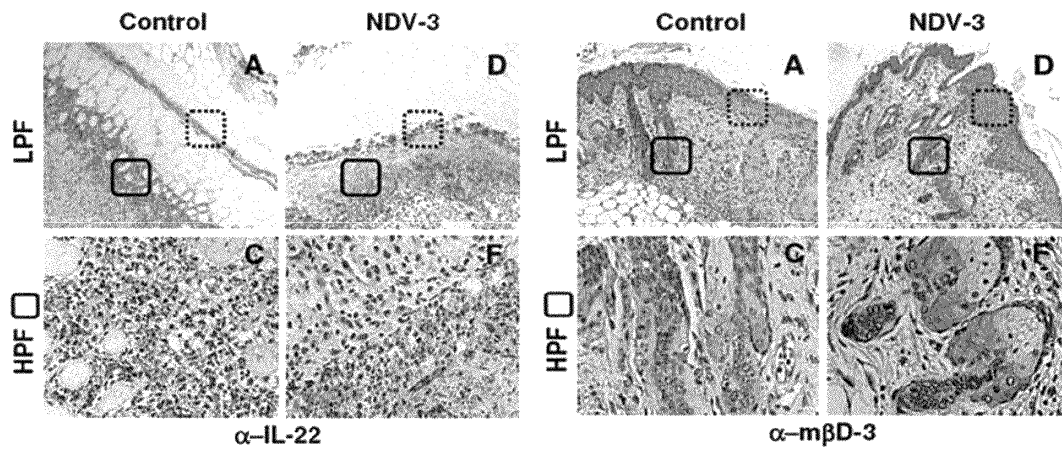
NDV-3 Capta Células y CD3+ e Induce la Expresión de IL-17



Datos procedentes de una dosis de 100 μ g 7 d después de la infección

FIGURA 8

NDV-3 Estimula la Expresión de IL-22 y la Respuesta de β -Defensina



Datos procedentes de una dosis de 100 μ g 7 d después de la infección

FIGURA 9

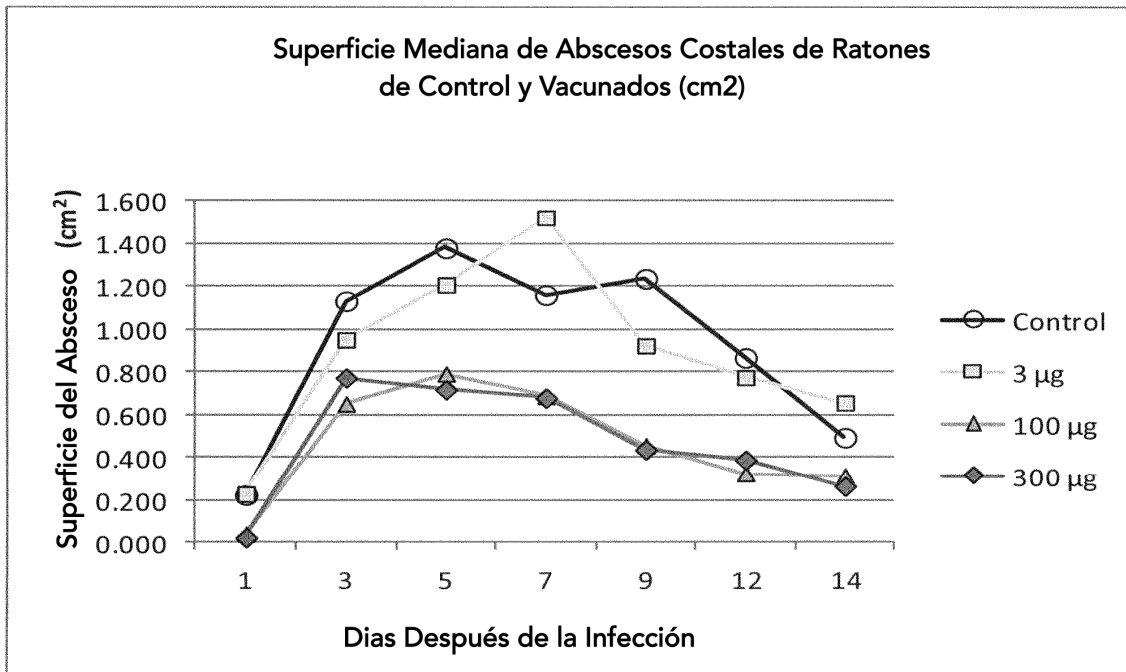


FIGURA 10

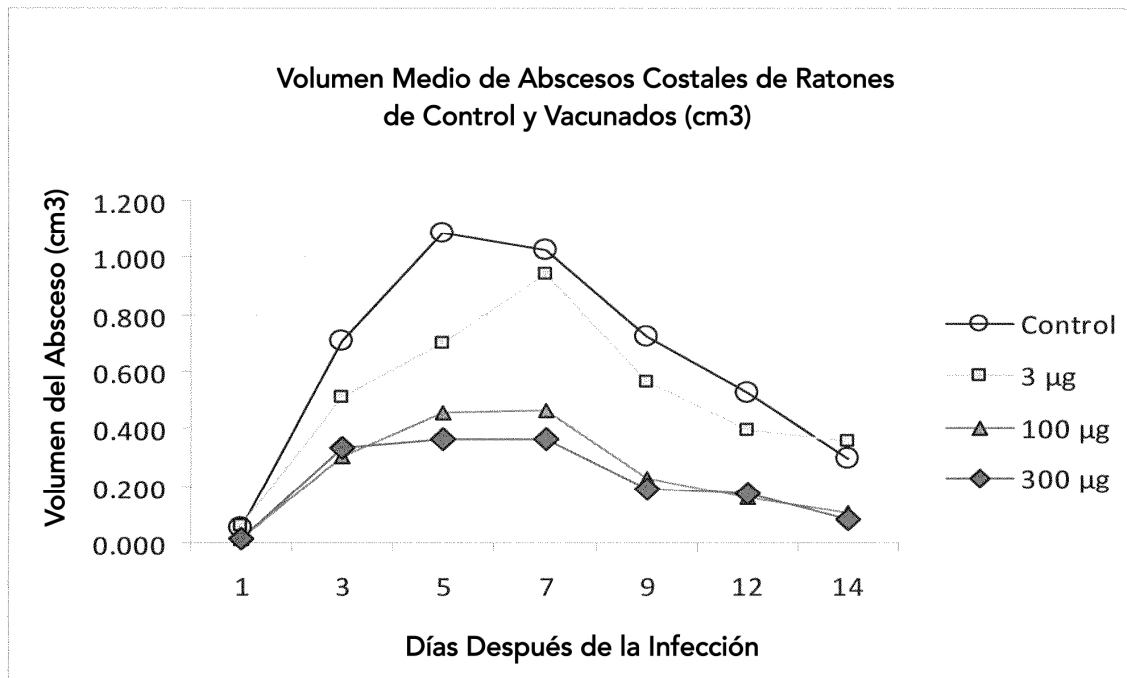
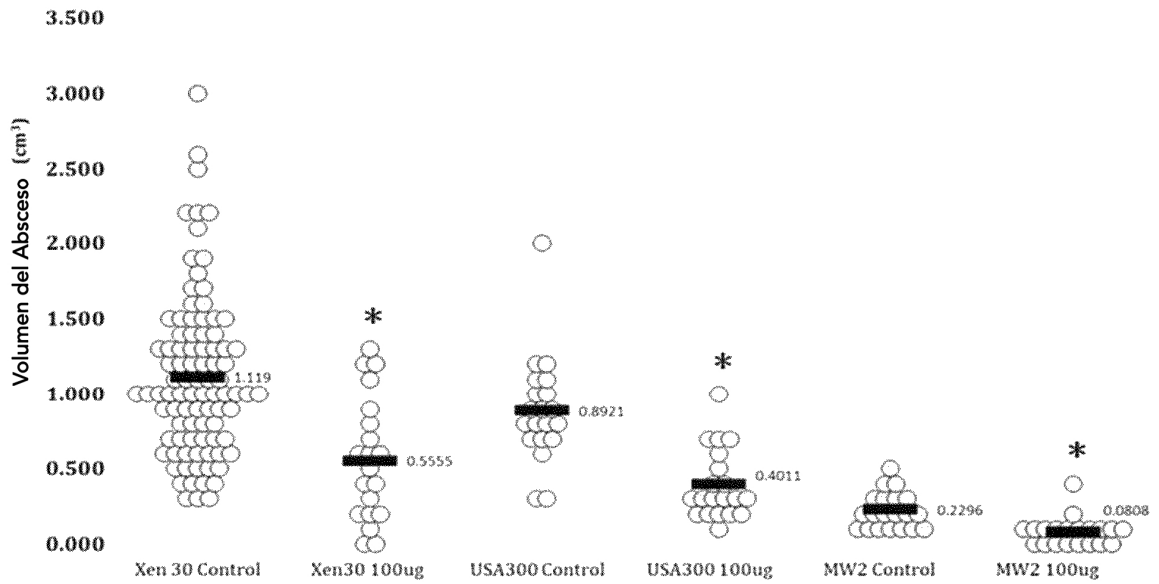


FIGURA 11
Volumen Medio de Abscesos de 7 d debido a Cepas de MRSA en Ratones de Control frente a Vacunados (cm³)



Cepas de MRSA frente a Régimen de Vacunación

FIGURA 12

Absceso por MRSA procedente de Ratones Vacunados con NDV-3 (100 µg)

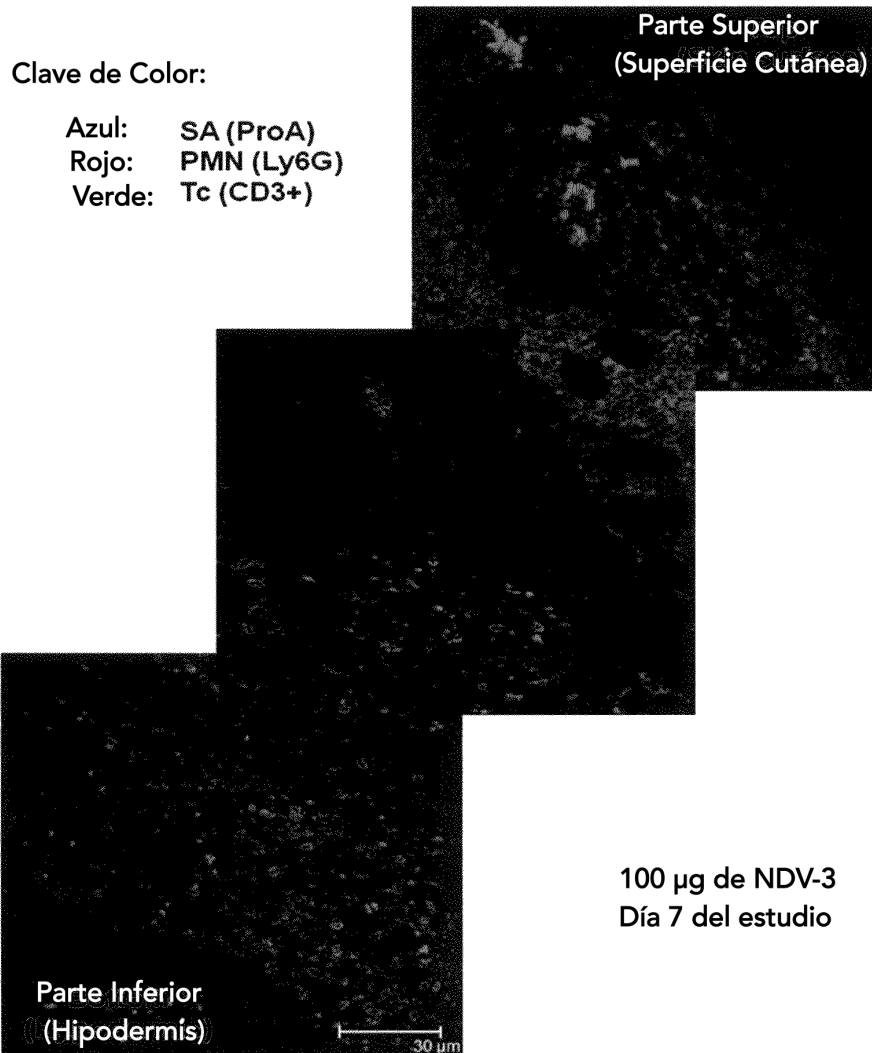


FIGURA 13
Absceso por MRSA procedente de Ratones de Control

